

การศึกษาบทบาทของยีนรูบิคอนในกุ้งที่ติดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว

The study of rubicon role in shrimp infected by  
White Spot Syndrome Virus



สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The study of rubicon role in shrimp infected by  
White Spot Syndrome Virus





A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE  
REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ACADEMIC YEAR 2022  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การศึกษาบทบาทของยีนรูบิคอนในกุ้งที่ติดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว The study of rubicon role in shrimp infected by White Spot Syndrome Virus
ชื่อนักศึกษา	นางสาวศิตภัทร รอดภัย รหัสนักศึกษา 62050572
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรรณันทกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ภัทรันดา จารีย์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.วรกฤต วรรณันทกิจ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ดร.ภัทรันดา จารีย์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## หนังสือแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน

ข้าพเจ้า..... ดร.ภัทรันดา จารีย์..... ตำแหน่ง..... นักวิจัย.....  
บริษัท..... ศูนย์วิจัยประยุกต์และพัฒนานวัตกรรมกึ่ง..... สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล.....  
ตั้งอยู่ที่..... 25/25 ถนนพุทธมณฑลสาย 4 ศาลายา พุทธมณฑล นครปฐม 73170.....

ได้รับนักศึกษา ชื่อ..... คีตภัทร รอดภัย..... รหัสนักศึกษา..... 62050572..... ของ  
สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม..... ภาควิชา..... ชีววิทยา..... คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เข้าร่วมโครงการสหกิจศึกษา ณ สถานที่ข้างต้น ระหว่าง  
วันที่..... 2 สิงหาคม 2565..... ถึงวันที่..... 15 ธันวาคม 2565..... ข้าพเจ้าขอแสดงเจตจำนงว่าด้วยการเผยแพร่ผลงาน ดังนี้

- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นความลับทางการค้าและเป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ในกรณีใด ๆ ทั้งสิ้น
- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท อนุญาตให้เผยแพร่ได้ ภายในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เพื่อประโยชน์ทางการศึกษาเท่านั้น
- ข้อมูลในรายงานฉบับนี้เป็นลิขสิทธิ์ของบริษัท อนุญาตให้เผยแพร่ออกสู่สาธารณะได้

ในกรณีที่มีการพิจารณาโครงการ/ผลงาน ดังกล่าวเข้าร่วมประกวด/แข่งขัน โครงการ/ผลงาน สหกิจศึกษาในทุก  
ระดับ ข้าพเจ้าขอแสดงเจตจำนงดังนี้

- อนุญาตให้นำโครงการ/ผลงาน เข้าร่วมประกวดสหกิจศึกษาในทุกระดับ
- ไม่อนุญาตให้นำโครงการ/ผลงาน เข้าร่วมประกวดสหกิจศึกษาในทุกระดับ

Digitally signed by  
phattarunda.jar  
Date: 2023.01.06  
15:33:45 +07'00'  
(ลงชื่อ).....ผู้แสดงเจตจำนง  
(.....ดร.ภัทรันดา จารีย์.....)

(ลงชื่อ).....ผู้แทนภาควิชา/คณะ  
(... ผศ.ดร.วรกฤต วรนนท์กิจ...)

(ลงชื่อ).....พยาน  
(...ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์.....)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การศึกษาบทบาทของยีนรูปคอนในกึ่งที่ติดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว
ชื่อนักศึกษา	นางสาวศศิภัทร รอดภัย รหัสนักศึกษา 62050572
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรรณันทกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.ภัทรันดา จารีย์

### บทคัดย่อ

โรคตัวแดงดวงขาว มีการแพร่ระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมกึ่งทั่วโลก ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ซึ่งในปัจจุบันก็ยังไม่สามารถยับยั้งการระบาดของโรคได้ การศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกึ่ง ก็อาจเป็นแนวทางหนึ่งที่กำลังแก้ปัญหาได้ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการออโตฟาจี หรือการกินตัวเองของเซลล์ สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในเซลล์ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาบทบาทของยีนรูปคอน ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญในกระบวนการออโตฟาจี ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว การศึกษานี้ได้ทำการค้นหาลำดับสารพันธุกรรมของรูปคอนของกึ่งขาว ตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอน ศึกษาบทบาทของยีนรูปคอนในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค RNA interference โดยการสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีนรูปคอน ซึ่งนำไปทดสอบประสิทธิภาพของ dsRUB ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอนในกึ่ง จากนั้นได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไวรัส VP28 และบันทึกอัตราการตายสะสมของกึ่ง จากการทดลองพบว่ายีนรูปคอนมีการแสดงออกมากที่สุดในลำไส้ จากการทดสอบประสิทธิภาพ dsRUB ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อกรัมกึ่ง พบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอนในกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ซึ่งยีน VP28 มีการแสดงออกลดลงในกึ่งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอน ทั้งนี้กึ่งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอน มีอัตราการตายของกึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม และหลังกึ่งติดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 30 ชั่วโมง มีปริมาณไวรัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ พบว่าระดับการแสดงออกของยีนรูปคอนมีความเกี่ยวข้องในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกึ่ง ซึ่งการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของยีนรูปคอนหลังติดไวรัสตัวแดงดวงขาว อาจเกิดมาจากการเหนี่ยวนำของไวรัส เพื่อต้องการใช้บทบาทของรูปคอนในการเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายในกึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ หรือทรัพย์สินทางปัญญาของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	The study of rubicon role in shrimp infected by White Spot Syndrome Virus
<b>Students</b>	Miss Khitaphat Rodphai Student ID 62050572
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
<b>Department</b>	Biology
<b>School</b>	Science
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
<b>Academic Year</b>	2022
<b>Advisor</b>	Asst.Prof.Dr.Worakrit Worananthakij
<b>Co-advisor</b>	Dr.Phattarunda Jaree

### Abstract

The white spot disease has been spread out and accounted for economic losses in shrimp industry around the world. Presently, this spreading is uncontrollable. Further research on the shrimp immune system may be one of the solutions. The previous study has revealed that the autophagy process, the self-eating of cells, can eliminate foreign materials entering the cell. Therefore, this study aims to investigate the role of rubicon gene, a key protein in autophagy, in white spot syndrome virus (WSSV) infected shrimp. In the experiment, the genomic sequences of rubicon in *P. vannamei* were searched and its expression was examined. Then, the role of the rubicon during WSSV infection was investigated by using RNA interference, mediated via a double-stranded RNA targeting rubicon (dsRUB). The results revealed that rubicon gene was highly expressed in an intestine. An injection of dsRUB at a concentration of 1 microgram per gram of shrimp could suppress the expression of rubicon gene in WSSV-infected shrimp, resulting in a reduction in the expression of the viral gene, VP28. The mortality rate of shrimp with knockdown of rubicon gene was lower than that of the control group and the amount of viral copy number was decreased after 30 hours of infection. All investigations suggest that the expression levels of rubicon genes are involved in WSSV infection. It might be induced by virus particles in order to use the rubicon for replication and dissemination in shrimp.

**Keywords:** Autophagy, Rubicon, White spot syndrome virus, *Penaeus vannamei*, RNA interference

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยผู้จัดทำเอกสารนี้ได้รับอนุญาตจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีให้สามารถนำเอกสารนี้ไปใช้เพื่อการศึกษาได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการศึกษาบทบาทของยีนรูปคอน สำเร็จลุล่วงได้ดีเนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ภัทรันดา จารีย์ รวมถึงบุคลากรของศูนย์วิจัยสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในงานวิจัยจนสำเร็จตามแผนงานที่วางไว้ ได้สอนการใช้เทคนิคและเครื่องมือต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการทำงานวิจัยในครั้งนี้ อีกทั้งยังให้คำแนะนำ และปรับปรุงงานวิจัยฉบับนี้ให้ได้เป็นฉบับที่สมบูรณ์ ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและทุ่มเทของอาจารย์ และบุคลากรในสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาและ ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้คำแนะนำในการปฏิบัติสหกิจศึกษา ให้คำปรึกษาในการปรับปรุงงานวิจัยภายในเล่ม และได้กรุณาให้คำแนะนำช่วยเหลือด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่ง

ศิตภัทร รอดภัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Penaeus vannamei</i> .....	3
2.2 ไวรัสตัวแดงดวงขาว.....	3
2.3 ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง.....	4
2.3.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยเซลล์.....	4
2.3.2 ระบบภูมิคุ้มกันที่มีการตอบสนองโดยการหลั่งสารน้ำ.....	4
2.4 กระบวนการออโตฟาจี.....	4
2.5 กระบวนการออโตฟาจีกับไวรัส.....	5
2.6 กระบวนการออโตฟาจีในกุ้ง.....	6
2.6.1 กระบวนการออโตฟาจีในกุ้ง <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	6
2.6.2 กระบวนการออโตฟาจีในกุ้ง <i>Cherax quadricarinatus</i> .....	6
2.7 รูบิคอน.....	7
2.8 RNA interference.....	7
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>8</b>
3.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีนรูบิคอน.....	8
3.1.1 การสืบค้นข้อมูล.....	8
3.1.2 การหา Conserve domain.....	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุใดแบบลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 การสร้าง phylogenetic tree.....	8
3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอนในเนื้อเยื่อถุงปกติ.....	9
3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอนในถุงที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	10
3.3.1 การเตรียมบ่อเลี้ยงกุ้ง และการเก็บตัวอย่างกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	10
3.3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง.....	10
3.3.3 การสร้าง first-stranded cDNA.....	11
3.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอน.....	12
3.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีนรูปคอน.....	12
3.4.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	12
3.4.2 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และการวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer.....	13
3.4.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์.....	13
3.4.4 การ ligation.....	14
3.4.5 การ Transformation.....	15
3.4.6 การคัดเลือก positive clone ด้วยเทคนิค colony PCR.....	16
3.4.7 Plasmid extraction โดย Presto™ Mini Plasmid Kit.....	17
3.4.8 การคัดเลือก positive clone ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI... ..	18
3.4.9 การเพิ่มจำนวน DNA แม่แบบ สำหรับการนำไปผลิต dsRNA.....	18
3.4.10 การสร้าง dsRNA ที่จำเพาะกับยีนรูปคอน.....	19
3.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsRUB ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอน ในกุ้ง.....	20
3.6 การศึกษาบทบาทของยีนรูปคอนในถุงที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	21
3.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอน และยีนไวรัส VP28 ในกุ้ง.....	20
3.6.2 การบันทึกอัตราการตายของกุ้ง.....	21
3.6.3 การตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว.....	21
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	22
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>24</b>
4.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม.....	24
4.1.1 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	24
4.1.2 การทำนาย conserved domain.....	25
4.1.3 การสร้าง phylogenetic tree.....	25
4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอนในเนื้อเยื่อถุงปกติ.....	26
4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอนในถุงที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอนในเนื้อเยื่อถุงปกติ..... 26 คำ  
ไม่ว่ากรณีใดๆ 4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอนในถุงที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว..... 26

4.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีนรูปิคอน .....	27
4.4.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR .....	27
4.4.2 การทำขึ้นยีนรูปิคอนให้บริสุทธิ์ .....	28
4.4.3 การคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค blue-white screening .....	28
4.4.4 การคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค colony PCR .....	29
4.4.5 การคัดเลือกโคลนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> .....	29
4.4.6 การเพิ่มจำนวนยีนรูปิคอน และต่อ T7 promoter ด้วยเทคนิค PCR .....	30
4.4.7 การทำขึ้นยีนรูปิคอนที่มีส่วนของ T7 promoter ให้บริสุทธิ์ .....	30
4.4.8 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีนรูปิคอน .....	31
4.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsRUB ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปิคอน ในกิ้ง .....	32
4.6 การศึกษาบทบาทของยีนรูปิคอนในกิ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว .....	33
4.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปิคอน และยีนไวรัส VP28 .....	33
4.6.2 การบันทึกอัตราการตายของกิ้ง .....	35
4.6.3 การตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว .....	36
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b> .....	38
5.1 สรุปผลการวิจัย .....	38
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	39
เอกสารอ้างอิง .....	40
ภาคผนวก .....	43
ภาคผนวก ก .....	44
ภาคผนวก ข .....	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction) .....	9
3.2 แสดงอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำ qPCR แต่ละขั้นตอน (PCR Condition).....	9
3.3 แสดงส่วนประกอบจากชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermoscientific) ของสารที่ใช้ในการสร้าง cDNA.....	11
3.4 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	12
3.5 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification).....	12
3.6 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation.....	14
3.7 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB.....	15
3.8 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective media) สำหรับการคัดเลือก แบบ blue-white screening .....	15
3.9 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	16
3.10 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification) .....	16
3.11 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการ cut check ด้วย restriction enzyme EcoRI.....	18
3.12 แสดงส่วนประกอบของสารเคมี ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	18
3.13 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification) .....	19
3.14 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการสร้าง dsRNA ด้วยชุด T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA production system (Promega).....	20
3.15 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction) .....	22
3.16 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction) .....	22
4.1 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR product ด้วย nanodrop spectrophotometer...	27
4.2 ผลการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วย nanodrop spectrophotometer .....	29
4.3 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR product ของชิ้นยีนรูปิคอนที่ต่อด้วย T7 promoter ด้วย nanodrop spectrophotometer .....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงกระบวนการและกลไกควบคุมหลักของออโตฟาจี .....	5
3.1 pGEM®-T Easy Vector (promega).....	14
4.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของรูบิคอนของกุ้งขาว <i>Penaeus vannamei</i> .....	23
4.2 การทำนาย conserved domain ของโปรตีนรูบิคอน .....	24
4.3 แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรตีนรูบิคอน .....	24
4.4 แสดงผลการแสดงออกของยีนรูบิคอนในเนื้อเยื่อกุ้งปกติ.....	25
4.5 การแสดงออกของยีนรูบิคอน เมื่อติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว .....	26
4.6 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ PCR product ของยีนรูบิคอนด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	26
4.7 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ purified PCR product ของยีนรูบิคอนด้วย เทคนิค agarose gel electrophoresis.....	27
4.8 แสดงผลการคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค blue white screening .....	27
4.9 แสดงผลการคัดเลือกโคลนจากการทำ colony PCR และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	28
4.10 แสดงผลการตรวจสอบการคัดเลือกด้วยการใช้ <i>EcoRI</i> ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis .....	28
4.11 ผลการตรวจสอบ PCR Product ของยีนรูบิคอนที่มีส่วนของ T7 promoter ด้วย เทคนิค agarose gel electrophoresis .....	29
4.12 แสดงผลการตรวจสอบยืนยัน purified Rubicon-T7F/R และ Rubicon-F/T7R ด้วย เทคนิค agarose gel electrophoresis .....	30
4.13 แสดงผลการตรวจสอบ dsRUB ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	30
4.14 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในกุ้ง เมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกของ ยีนรูบิคอนด้วย dsRUB .....	31
4.15 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว เมื่อถูก ยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอนด้วย dsRUB .....	32
4.16 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว ...	32
4.17 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว ...	33
4.18 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว .....	33
4.19 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว.....	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.20 แสดงอัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน รูปคอนด้วย dsRUB เทียบกับกุ้งกลุ่มควบคุม .....	35
4.21 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number) ในกุ้งหลัง ติดโรคตัวแดงดวงขาว .....	36



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
WSSV	White spot syndrome virus
Amp	Ampicillin
IPTG	Isopropyl-B-D triogalactopyranoside
DEPC	Diethylpyrocarbonate
UP H <sub>2</sub> O	Ultra-pure H <sub>2</sub> O
dsRNA	Double-stranded RNA
PCR	Polymerase chain reaction
DNA	Deoxyribonucleotide acid
RNA	Ribonucleotide
Rubicon	Run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีความต้องการบริโภคกุ้งทะเลทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ปัจจุบันอุตสาหกรรมประมงประสบปัญหาผลผลิตกุ้งลดลง ซึ่งมีสาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากการระบาดของโรควุ้นทั้งโรคที่อุบัติใหม่และโรคที่ระบาดซ้ำ ซึ่งเป็นปัญหาที่ยังไม่สามารถแก้ไขได้ โดยหนึ่งในโรคที่ระบาดซ้ำอยู่ในปัจจุบันนี้ คือโรคตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome disease; WSD) เกิดจากไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus; WSSV) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายมากที่สุดต่ออุตสาหกรรมกุ้ง เพราะเมื่อกุ้งติดโรคนี้อาจกินอาหารน้อยลง มีลักษณะตัวแดง เปลือกนูน มีจุดขาวเกิดขึ้นที่เปลือกส่วนหัวของกุ้ง และมีอัตราการตาย 90-100% ภายใน 3-10 วัน

จากการศึกษาองค์ความรู้ใหม่ เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งการระบาด ซึ่งก็คือกระบวนการออโตฟาจี ออโตฟาจีเป็นกระบวนการกินตัวเองของเซลล์ ที่กำจัดโปรตีนหรือองค์ประกอบของเซลล์ที่เสื่อมสภาพ โดยองค์ประกอบเหล่านี้จะถูกบรรจุในถุงออโตฟาโกโซม (Autophagosome) หลังจากนั้นออโตฟาโกโซมจะรวมตัวกับไลโซโซม (lysosome) ทำให้เกิดการย่อยสลายองค์ประกอบที่เสื่อมสภาพได้ มีรายงานว่ากระบวนการออโตฟาจี มีความสามารถในการกำจัดไวรัส โดยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสเจ้าบ้าน (host) แต่ในอีกทางหนึ่งก็มีรายงานว่า กระบวนการนี้สามารถถูกกระตุ้นด้วยไวรัส เพื่อช่วยไวรัสในการแพร่กระจายในเซลล์เจ้าบ้านได้ โดยในกระบวนการออโตฟาจีมีโปรตีนที่สนใจคือ รูบิคอน (Rubicon หรือ Run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing) ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการออโตฟาจี

รูบิคอน เป็นตัวควบคุมกระบวนการออโตฟาจี (autophagy regulator) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มี RUN domain ถูกระบุว่าเป็นหน่วยย่อย PI3KC3 ผ่านการเชื่อมโยงกับ Beclin 1 รูบิคอนทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบของ PI3KC3 และจะยับยั้งการเจริญเติบโตของออโตฟาโกโซม โดย RUN domain มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการทำงานของรูบิคอน ในการยับยั้งกิจกรรมของ PI3KC3 lipid kinase และกระบวนการออโตฟาจี

ดังนั้นในหัวข้อสหกิจศึกษาครั้งนี้จึงสนใจทำการศึกษาบทบาทของยีนรูบิคอนในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว โดยองค์ความรู้ใหม่ที่ได้อาจสามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ เพื่อช่วยแก้ไขปัญหาระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในอุตสาหกรรมกุ้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาลำดับสารพันธุกรรมของยีนรูปคอนในกุ้งขาว
- 2) เพื่อศึกษาบทบาทของยีนรูปคอนในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ค้นหาและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของรูปคอนของกุ้งขาว
- 2) ศึกษาการแสดงออกของยีนรูปคอนในเนื้อเยื่อกุ้ง และในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว
- 3) ศึกษาบทบาทของรูปคอนในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค RNA interference

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบถึงบทบาทของยีนรูปคอนในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งองค์ความรู้นี้สามารถนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในอุตสาหกรรมกุ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 กุ้งขาว *Penaeus vannamei*

กุ้งขาว มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษ คือ pacific white shrimp มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Penaeus vannamei* หรือ *Litopenaeus vannamei* มีลำตัวสีขาวใส หางสีแดง ปลายหางจะมีสีแดงเข้ม (V.N. and Gunalan., 2016) กุ้งขาวเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีความต้องการบริโภคกุ้งทะเลทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ และมีส่วนช่วยอย่างมากในการพัฒนาเศรษฐกิจโลก ได้แก่ ประเทศจีน อินเดีย อินโดนีเซีย และเวียดนาม ซึ่งในปี 2020 มีการผลิตกุ้งขาวทั่วโลกอยู่ที่ประมาณ 5.82 ล้านตัน และมีอัตราการเติบโตต่อปีลดลง 2.15% โดยโรคที่เกิดในกุ้งขาว *P. vannamei* เป็นสาเหตุหลักประการหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตลดลง ส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย (Ninawe and Selvin., 2009) การติดเชื้อไวรัสมักก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากต่อการเลี้ยงกุ้ง (Karunasaga and Ababouch., 2012) เช่น white spot syndrome virus (WSSV), monodon-type baculovirus (MBV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), hepatopancreatic parvovirus (HPV), และ lymphoid parvo-like virus (LPV) เป็นต้น (Xu et al., 2022)

### 2.2 ไวรัสตัวแดงดวงขาว

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus; WSSV) ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome disease; WSD) ซึ่งเป็นโรคที่ร้ายแรงในอุตสาหกรรมกุ้ง ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมทั่วโลก ไวรัสตัวแดงดวงขาวถูกพบครั้งแรกในปี 1992 หลังจากการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในฟาร์มกุ้งของจีน (Chou et al., 1995) และได้แพร่กระจายไปทั่วโซนหลักของการเลี้ยงกุ้งในเอเชีย ออสเตรเลีย อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ (Bondad-Reantaso et al., 2001) โดยอาการของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะเซื่องซึม ตัวย่อนเปลี่ยนสี กินอาหารน้อยลง และมีจุดขาวเกิดขึ้นที่เปลือกส่วนหัวของกุ้ง อัตราการตายของกุ้งจะสูงอย่างต่อเนื่อง โดยจะตาย 90 ถึง 100% ภายใน 3 ถึง 10 วันหลังการติดเชื้อ (Millard et al., 2021) ปัจจุบันยังไม่สามารถป้องกันหรือยับยั้งการสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เกิดจากการระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

## 2.3 ระบบภูมิคุ้มกันของกิ้ง

ระบบภูมิคุ้มกันของกิ้ง เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) เป็นระบบที่ไม่สามารถจดจำความแตกต่างของสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพต่างๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และไม่มี การสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอม ระบบภูมิคุ้มกันของกิ้งมี 2 ระบบคือ ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยเซลล์ (cellular immune response) และระบบภูมิคุ้มกันที่มีการตอบสนองโดยการหลั่งสารน้ำ (humoral immune response)

### 2.3.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยเซลล์ (cellular immune response)

เป็นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย เช่น กระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) และ กระบวนการอะพอพโทซิส (Apoptosis) มีรายงานว่ามียาที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกิ้ง (Wang and Zhang, 2008)

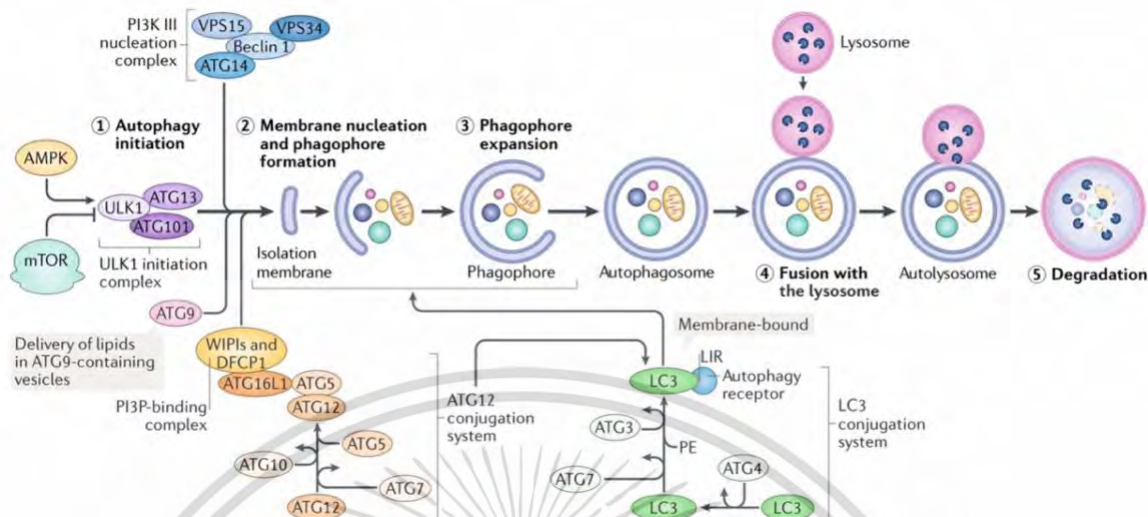
### 2.3.2 ระบบภูมิคุ้มกันที่มีการตอบสนองโดยการหลั่งสารน้ำ (humoral immune response)

เป็นการทำงานของโปรตีนต่างๆ ที่อยู่ในน้ำเลือด เช่น แอ็กกูตินิน (agglutinin) สารคล้ายไซโตไคน์และคอมพลีเมนต์ (cytokine and complement like factors) โมดูเลเตอร์ (modulators) สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting proteins) และสารน้ำที่เป็นผลิตภัณฑ์จากระบบโปรฟีนอลออกซิเดส ที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือด สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide, AMPs) และกระบวนการสร้างสารเมลานินที่เปลือก (melanisation) ที่เกี่ยวข้องกับระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (prophenoloxidase cascade, proPO) (Soderhall and Cerenius., 1992)

## 2.4 กระบวนการออโตฟาจี

กระบวนการออโตฟาจี หมายถึงกระบวนการการกินตัวเองของเซลล์ เป็นกระบวนการที่เกิดปกติภายในเซลล์ต่างๆของร่างกาย เพื่อกำจัดโปรตีนหรือองค์ประกอบของเซลล์ที่เสื่อมสภาพ (Levine et al., 2008) โดยองค์ประกอบดังกล่าวจะถูกบรรจุอยู่ในถุงออโตฟาโกโซม (Autophagosome) หลังจากนั้นออโตฟาโกโซมจะรวมตัวกับไลโซโซม (Lysosome) ทำให้เกิดการย่อยสลายองค์ประกอบในออโตฟาโกโซมได้ กระบวนการออโตฟาจีถูกค้นพบครั้งแรกว่าเป็นกลไกการอยู่รอดในยีสต์ที่ขาดสารอาหาร (Alvers et al., 2009) และกระบวนการออโตฟาจีมักถูกพบในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติเกี่ยวข้องกับอายุ เช่น มะเร็ง เบาหวาน และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (Huang et al., 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 แสดงกระบวนการและกลไกควบคุมหลักของออโตฟาจี

ที่มา : <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>

โดยกระบวนการออโตฟาจี แบ่งเป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้ (Hansen et al., 2018)

#### 1) Autophagy initiation

เป็นกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตเพื่อกระตุ้นการทำงานของกลุ่มโปรตีนเริ่มต้น เช่น ATG

#### 2) Membrane nuclear ion and phagophore formation

เป็นขั้นตอนเริ่มสร้างเยื่อหุ้มฟาโกพอร์ (Phagophore) โดยเยื่อหุ้มจะก่อตัวเป็นรูปกล้วยเพื่อโอบล้อมโปรตีน องค์ประกอบของเซลล์ที่เสื่อมสภาพ หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในเซลล์

#### 3) Phagophore expansion

ในขั้นตอนนี้เยื่อหุ้มฟาโกพอร์จะเกิดการ elongation เพื่อขยายและสร้างถุงฟาโกพอร์ เพื่อเก็บโปรตีน องค์ประกอบของเซลล์ที่เสื่อมสภาพ และสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในเซลล์

#### 4) Fusion with the lysosome

เมื่อฟาโกพอร์ปิดสนิทจะกลายเป็นออโตฟาโกโซม หลังจากนั้นออโตฟาโกโซมจะรวมตัวกับไลโซโซม

#### 5) Degradation

สุดท้ายจะเกิดการย่อยสลายโปรตีนหรือองค์ประกอบที่เสื่อมสภาพในออโตฟาโกโซมได้

## 2.5 กระบวนการออโตฟาจีกับไวรัส

กระบวนการออโตฟาจี ทำหน้าที่สร้างสมดุลเมแทบอลิซึมของเซลล์ และส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ในสภาวะเครียด (Mizushima et al., 2008) โดยมีรายงานว่าได้มีการส่งสัญญาณกระตุ้นเอกซาร์นี้ กระบวนการออโตฟาจี ในระหว่างการติดเชื้อไวรัส โดยทำหน้าที่เป็นกลไกเฝ้าระวังที่ส่งแอนติเจนของไวรัสไปสู่ออโตฟาโกโซม ซึ่งสามารถย่อยสลายไวรัสได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสหลายชนิดสามารถยับยั้งหรือหลีกเลี่ยงการเกิดออโตฟาโกโซมได้ โดยการยับยั้งหรือหลีกเลี่ยงการเกิดออโตฟาโกโซมนี้สามารถทำได้โดยการยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดออโตฟาโกโซม

ไวรัสไปยังไลโซโซมเพื่อกำจัดไวรัส โดยส่งส่วนประกอบของไวรัสไปยังเอนโดโซม (endosome) เพื่อกระตุ้นการส่งสัญญาณภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติ (Delgado et al., 2009) นอกจากนี้โอโตฟาโกโซม ยังมีความสามารถในการดักจับ และย่อยสลายเชื้อโรคภายในเซลล์ หรือเรียกว่ากระบวนการ xenophagy ซึ่งเป็นความสามารถในการต้านไวรัสของโอโตฟาโกโซม (Virgin et al., 2009) ในทางกลับกัน พบว่ามีไวรัสบางตัวสามารถกระตุ้นกระบวนการโอโตฟาจี เพื่อประโยชน์ของตัวไวรัสเอง เช่น การช่วยเพิ่มปริมาณไวรัส เป็นต้น (Virgin et al., 2009) ดังนั้นไวรัสจึงได้พัฒนาวิธีการต่างๆ มากมาย เพื่อยับยั้งและทำลายกระบวนการโอโตฟาจี และเพื่อประโยชน์ของตัวเอง

## 2.6 กระบวนการโอโตฟาจีในกุ้ง

กระบวนการโอโตฟาจี มีส่วนร่วมในการติดเชื้อไวรัสในสัตว์จำพวกครัสเตเชียน เช่น ไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) เป็นเชื้อก่อโรคร้ายแรงที่สุดสำหรับกุ้งที่เลี้ยงในฟาร์ม ซึ่งกระบวนการโอโตฟาจีมีบทบาทต้านไวรัสโดยการทำลายอนุภาคไวรัสโดยตรง หรือควบคุมการอักเสบและการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับ interferon (Derelict et al, 2012)

### 2.6.1 กระบวนการโอโตฟาจีในกุ้ง *Litopenaeus vannamei*

มีการศึกษานี้ได้ทำการศึกษากุ้งขาว *L. vannamei* โดยใช้ Rapamycin ซึ่งเป็นสารควบคุมกระบวนการเซลล์กินตัวเอง (autophagy modulator) สามารถยับยั้งการส่งสัญญาณ mTOR ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการโอโตฟาจี (Blommaert et al, 1995) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการโอโตฟาจี เมื่อฉีด Rapamycin จะทำให้เกิดการส่งสัญญาณ PI3K-Akt ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการโอโตฟาจี โดย PI3K ทำให้ mTOR ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมอย่างรวดเร็ว ควบคุมเมแทบอลิซึมของเซลล์ ตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน โดยการควบคุม kinase Akt ซึ่งการส่งสัญญาณ PI3K-AKT-mTOR จะทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการโอโตฟาจี (Wu et al., 2019)

MicroRNAs (miRNAs) เป็นสารควบคุมหลังการถอดรหัสที่สำคัญ มีบทบาทสำคัญในการต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่พึงประสงค์โดยการควบคุมกระบวนการโอโตฟาจี จากผลงานวิจัยพบว่า pva-miR-252 ในกุ้งขาวสามารถควบคุมกระบวนการโอโตฟาจีผ่าน PvPI3K และปรับปรุงการทำงานของเอนไซม์ในกุ้งขาว ภายใต้ความเครียดจากแอมโมเนียไนโตรเจน (Wang et al., 2021)

### 2.6.2 กระบวนการโอโตฟาจีในกุ้ง *Cherax quadricarinatus*

การติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เกิดการกระตุ้นกระบวนการโอโตฟาจีในเซลล์ Hpt ของกุ้ง *C. quadricarinatus* ซึ่งพบโอโตฟาโกโซมที่มี WSSV virions อย่างชัดเจนจากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) โดยโปรตีน CqGABARAP ในเซลล์ Hpt ของกุ้ง *C. quadricarinatus* มีส่วนช่วยในการรวมตัวของไวรัสตัวแดงดวงขาวในไซโตพลาสซึม (Chen et al,

2016) ดังนั้นผลจากงานวิจัยนี้พบว่า เมื่อกุ้งเครปซ *C. quadricarinatus* ติดโรคตัวแดงดวงขาว กระบวนการโอโตฟาจีจะถูกกระตุ้น เพื่อช่วยเพิ่มจำนวนไวรัสในกุ้ง

เอกสารนี้จัดทำขึ้นเพื่อเป็นเอกสารอ้างอิงเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้

## 2.7 รูบิคอน

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ารูบิคอนมีบทบาทในหลายกระบวนการ เช่น ออโตฟาจี ฟาโกไซโตซิส และ CBM complex รูบิคอน เป็นตัวควบคุมกระบวนการออโตฟาจี (autophagy regulator) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มี RUN domain ถูกระบุว่า เป็นหน่วยย่อย PI3KC3 ผ่านการเชื่อมโยงกับ Beclin 1 รูบิคอนทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบของ PI3KC3 และจะยับยั้งการเจริญเติบโตของออโตฟาโกโซม โดย RUN domain มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการทำงานของรูบิคอน ในการยับยั้งกิจกรรมของ PI3KC3 lipid kinase และกระบวนการออโตฟาจี (Sun et al., 2011) อีกทั้งยังพบว่า รูบิคอนเป็นตัวยับยั้งการตอบสนองของการส่งสัญญาณ pattern recognition receptors (PRR) ที่เป็นสื่อกลาง CBM complex เพื่อป้องกันการตอบสนองการอักเสบ (Gross et al., 2006) รูบิคอนในกระบวนการออโตฟาจี กระบวนการฟาโกไซโตซิส และ CBM complex นั้นจะทำหน้าที่ต่างกัน ดังนั้นรูบิคอนจึงกำหนดเป้าหมายการส่งสัญญาณที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสิ่งเร้าจากสิ่งแวดล้อม รวมถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่างๆ ต่อการติดเชื้อจุลชีพ โดยเฉพาะเชื้อไวรัส (Yang et al., 2012)

## 2.8 RNA interference

RNA interference (RNAi) เป็นกระบวนการยับยั้งการทำงานของยีน โดยการแทรก messenger RNA (mRNA) บนยีนเป้าหมายด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) ที่มีความจำเพาะเจาะจง ส่งผลให้ mRNA ถูกทำลายและหยุดการสร้างโปรตีน (Zamore et al., 2000) RNAi เป็นส่วนสำคัญต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสและสารพันธุกรรม (Judge et al., 2005) ทั้งนี้ RNAi เป็นตัวควบคุมที่สำคัญต่อความเสถียรของจีโนม และการแสดงออกของยีน (Castel et al., 2013) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในยูคาริโอต โดยการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานทางสรีรวิทยาของเซลล์ต่างๆ RNAi สามารถจดจำ dsRNA ที่เกี่ยวข้องกับไวรัส และสามารถย่อยสลายมันได้ตั้งนั้น จึงฆ่าไวรัสได้ (Li et al., 2021)

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีนรูบิคอน

#### 3.1.1 การสืบค้นข้อมูล

ค้นหาข้อมูลของยีน/โปรตีนที่ทำงานในกระบวนการอโตฟาจี ที่อาจจะมีส่วนสำคัญหรือมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการติดไวรัสในสิ่งมีชีวิต โดยทำการสืบค้นวารสาร และผลงานตีพิมพ์ของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้ยื่นที่สนใจนำมาศึกษาต่อ คือ รูบิคอน

#### 3.1.2 การหา Conserve domain

1. ค้นหาลำดับสารพันธุกรรมของรูบิคอนในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* จากฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
2. เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เฉพาะบริเวณ CDS (Coding Sequence) ไปทำการแปลรหัส (Translate) ให้ได้เป็นลำดับกรดอะมิโน (amino acid) ด้วยโปรแกรม Translate tool ใน Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>)
3. นำลำดับกรดอะมิโนของรูบิคอนมาทำนาย conserved domain ด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)

#### 3.1.3 การสร้าง phylogenetic tree

1. ค้นหาลำดับกรดอะมิโนของรูบิคอนในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับกุ้ง จากฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
2. จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนอยู่ในรูปแบบ FASTA โดยใช้โปรแกรม TAB to FASTA ([http://sequenceconversion.bugaco.com/converter/biology/sequences/tab\\_to\\_fasta.php](http://sequenceconversion.bugaco.com/converter/biology/sequences/tab_to_fasta.php))
3. นำลำดับกรดอะมิโนของรูบิคอนจากแต่ละสิ่งมีชีวิตมาเปรียบเทียบ โดยเลือกคำสั่ง 'alignment' โดยการเปิด fasta file ผ่านโปรแกรม MEGA11 และบันทึกไฟล์เป็นรูปแบบ .MEGA
4. ทำการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA11 โดยเลือก Test of Phylogeny ให้เป็น Bootstrap method และเลือก no. of Bootstrap Replications ให้เป็น 1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอนในเนื้อเยื่อต่างๆ

นำ cDNA ที่ได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ ประกอบด้วย เหงือก (Gill) ลำไส้ (Intestine) ต่อม้ำเหลือง (Lymphoid) หัวใจ (Heart) กระเพาะ (Stomach) ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) และ เลือด (Hemocyte) มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอนด้วยเทคนิค quantitative PCR (qPCR) เริ่มจากการเตรียมส่วนประกอบสำหรับการทำ qPCR โดยใช้ส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR และ อุณหภูมิในการทำ qPCR ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μL)
Luna qPCR mix enzyme (NEB)	5
10 μM forward primer	0.15
10 μM reverse primer	0.15
UP H <sub>2</sub> O	3.7
Template cDNA	1
Total Volume (master mix = 9 μL)	10

ตารางที่ 3.2 แสดงอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำ qPCR แต่ละขั้นตอน (PCR Condition)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	ทำซ้ำ
Initial Denaturation	95 °C	1 นาที	40 รอบ
Denaturation	95 °C	15 วินาที	
Annealing	60 °C	30 วินาที	
Final extension	60 - 95 °C	7 นาที	

ในการทดลองนี้ ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอน โดยจะใช้เป็น internal control โดยจะทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน Elongation factor-1 alpha (EF-1α) ซึ่งเป็น House keeping gene ที่มีการแสดงออกคงที่ โดยจะทำการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนรูปคอน ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ตามสมการ (mathematic model) ของ Pfaffl ที่กำหนดค่า relative expression เท่ากับ  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Pfaffl., 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอนในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

#### 3.3.1 การเตรียมบ่อสำหรับเลี้ยงกึ่ง และการเก็บตัวอย่างกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

เตรียมบ่อสำหรับเลี้ยงกึ่ง ซึ่งกึ่งที่ใช้ในการทดลองจะมีการตรวจโรคด้วย strip test โดยทำการสุ่มตรวจทั้งไวรัสโอ ไวรัส และแบคทีเรียที่พบการระบาด จากนั้นเติมน้ำที่มีค่าความเค็มที่ 10 ppt ปริมาตร  $\frac{3}{4}$  ของบ่อ ทำการเตรียมสารละลายไวรัสสำหรับฉีดไวรัสเข้ากึ่ง เริ่มจากเจือจางความเข้มข้นของไวรัสตัวแดงดวงขาว  $10^{-4}$  เท่า ฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เจือจางแล้ว เข้ากึ่งตัวละ 50  $\mu\text{L}$  โดยใช้เข็มอินซูลิน จากนั้นจะทำการเก็บตัวอย่างทั้งเลือดและเหงือก หลังจากกึ่งติดไวรัสที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ในการเก็บตัวอย่างเลือดจะทำการเตรียมเข็มอินซูลิน ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 10% Trisodium citrate (anti coagulant) ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  ทำการดูดเลือดกึ่งจากแอ่งเลือด จากนั้นนำเลือดที่ได้มาฉีดใส่หลอด 1.5-mL ที่มี Genezol 500  $\mu\text{L}$  และนำไป vortex ให้เข้ากัน ในส่วนของการเก็บตัวอย่างเหงือก เก็บชิ้นส่วนเหงือกของกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว มาใส่ในหลอด 1.5-mL ที่มี Genezol 200  $\mu\text{L}$  บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำ Genezol 300  $\mu\text{L}$  และนำไป vortex ให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างที่ได้ในตู้เย็น  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อนำไปสกัดอาร์เอ็นเอต่อไป

เหตุผลในการเลือกตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอนในเลือดและเหงือก เนื่องจากในเลือดจะมีการตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อโรคได้ดี และไวรัสจะสามารถเพิ่มจำนวนได้ดีที่เหงือก

#### 3.3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกึ่ง

- นำตัวอย่างกึ่งที่อยู่ใน Genezol มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ เริ่มจากการเติม Chloroform 100  $\mu\text{L}$  จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันโดยการ vortex เป็นเวลา 30 วินาที นำไปทำการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ความเร็วรอบ 12,500 xg ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที
- เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้ว จะได้สารละลายเป็น 3 ส่วน คือส่วนของสารละลายใส (ชั้นบน) ตะกอนโปรตีน (ชั้นกลาง) และส่วนสารละลายใสสีชมพู (ชั้นล่าง) ให้ทำการดูดสารส่วนใสมาใส่หลอด 1.5-mL ใหม่ จากนั้นเติม isopropanol (ที่เย็น) 1 volume แล้วทำให้เข้ากันโดยการ พลิกหลอดกลับไปมาจำนวน 20 ครั้ง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
- จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 xg ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเหลือตะกอนสีขาวขุ่นที่ก้นหลอด
- เติม 70% Ethanol (ที่เย็น) 500  $\mu\text{L}$  แล้วทำให้สารละลายเข้ากันโดย พลิกหลอดกลับไปมาจำนวน 20 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ความเร็วรอบ 12,500 xg ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที
- เทส่วนใสทิ้ง จะเหลือตะกอน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ความเร็วรอบ 12,500 xg อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ดูดสารละลายที่เหลือออกจนหมด ให้เหลือไว้เพียงตะกอนเท่านั้น แล้วเปิดฝาหลอดทดลองเอาไว้ เพื่อเป็นการตากตะกอน (air dry) รอนจนตะกอนเปลี่ยนสี จากสีขาวขุ่นเป็นสีใส ประมาณ 10 นาที
7. เติมน้ำ DEPC เพื่อละลายตะกอน โดยตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที โดยทุกๆ 10 นาที จะทำให้เข้ากัน (mix) และ spin down
8. วัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer เริ่มจากเปิดเครื่อง nanodrop ตั้งค่า blank โดยใช้ น้ำ DEPC ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1  $\mu\text{L}$  กดปุ่มวัดความเข้มข้น และทำการบันทึก เมื่อวัดเสร็จแล้วให้ทำการล้างด้วยน้ำ DEPC อีกครั้งเพื่อทำความสะอาด
9. อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างกึ่ง เมื่อวัดความเข้มข้นแล้ว จะนำมาปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากัน ถ้าเป็นตัวอย่างจากเม็ดเลือดจะปรับให้มีความเข้มข้น 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  และถ้าเป็นตัวอย่างจากเหงือกจะปรับให้มีความเข้มข้น 300  $\text{ng}/\mu\text{L}$  เพื่อนำไปใช้ในการสร้าง cDNA ต่อไป

### 3.3.3 การสร้าง first-stranded cDNA

1. นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาสร้างเป็น cDNA ด้วยชุด RevertAid reverse transcriptase (Thermoscientific) โดยทำการเตรียมสารประกอบที่ใช้ในการสร้าง cDNA ดังแสดงในตารางที่ 3.3
2. จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR เพื่อสร้าง cDNA ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 นาที และอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที
3. เก็บ cDNA ที่ -20°C

ตารางที่ 3.3 แสดงส่วนประกอบจากชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermoscientific) ของสารที่ใช้ในการสร้าง cDNA

ส่วนประกอบ	ปริมาณ ( $\mu\text{L}$ )
5X reaction buffer	1
10 mM dNTP mix	0.5
Oligo dT primer	0.25
Ribolock RNase inhibitor	0.25
RevertAid- reverse transcriptas	0.25
RNA+DEPC H <sub>2</sub> O	2.75
Total volume	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอน

นำ cDNA ที่สร้างได้มาทำให้เจือจาง 5 เท่า ด้วยน้ำ UP H<sub>2</sub>O จากนั้นนำไปใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในกิ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค qPCR (ตามรายละเอียดที่ระบุในหัวข้อ 3.2)

## 3.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีนรูบิคอน

### 3.4.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

ทำการเพิ่มจำนวน DNA ของยีนรูบิคอนจาก cDNA ของกิ่งขาว ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ส่วนประกอบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และอุณหภูมิการทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และตารางที่ 3.5 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.4 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (μL)
UP H <sub>2</sub> O	40.25
10x PCR buffer	5
10μM dNTPsmix	1
10μM Forward primer	0.75
10μM Reward primer	0.75
Taq DNA polymerase	0.25
cDNA ของกิ่งขาว	2
total Volume	50

ตารางที่ 3.5 ขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	ทำซ้ำ
Initial Denaturation	94 °C	2 นาที	
Denaturation	94 °C	30 วินาที	
Annealing	58 °C	30 วินาที	30 รอบ
Extension	72 °C	1 นาที	
Final extension	72 °C	5 นาที	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.2 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และ การวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer

นำ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และนำไปวัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer

#### 1. เทคนิค agarose gel electrophoresis

เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1.2% เริ่มจากการชั่ง agarose gel 1.2 กรัม ใส่ในขวด หรือ flask เติมน้ำฟอสเฟต 1xTBE ปริมาตร 100 ml จากนั้นทำให้เจลละลายโดยการนำไปเข้าไมโครเวฟเป็นเวลา 1-2 นาที เมื่อได้สารละลาย agarose gel ที่สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วางพักไว้จนอุณหภูมิประมาณ 60°C เติมน้ำย้อมดีเอ็นเอ (Red safe) 3 และ 5  $\mu\text{L}$  ตามปริมาตรเจล 15 และ 25 mL ตามลำดับ

#### 2. การวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer

การวัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer เริ่มจากเปิดเครื่อง nanodrop จากนั้นทำการตั้งค่า blank โดยใช้ น้ำ DEPC และทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1  $\mu\text{L}$  กดปุ่มวัดความเข้มข้นและทำการบันทึก เมื่อวัดเสร็จแล้วให้ทำการล้างด้วยน้ำ DEPC อีกครั้ง เพื่อทำความสะอาด

โดยจะทำการบันทึกอัตราส่วนการดูดกลืนแสง 260/280 ( $A_{260/280}$ ) เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนในโปรตีน ถ้าค่าที่วัดได้มากกว่าหรือเท่ากับ 1.8 จะสามารถบอกได้ว่าตัวอย่าง DNA นั้นไม่มีโปรตีนปนเปื้อนและอัตราส่วนการดูดกลืนแสง 260/230 ( $A_{260/230}$ ) นั้นค่าที่มากกว่า 1.8 จะสามารถบอกได้ว่าตัวอย่าง DNA ไม่มีการปนเปื้อนสารประกอบอินทรีย์ (inorganic solvent) เช่น สารละลายเอทานอล

### 3.4.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (PCR purification) สามารถทำได้ 2 แบบ ใช้ชุด GenepHlow™ GeL/PCR (Geneaid)

ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปวัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบการแสดงผลออกด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis อีกครั้ง (ตามที่ได้ระบุไว้ใน หัวข้อ 3.4.2)

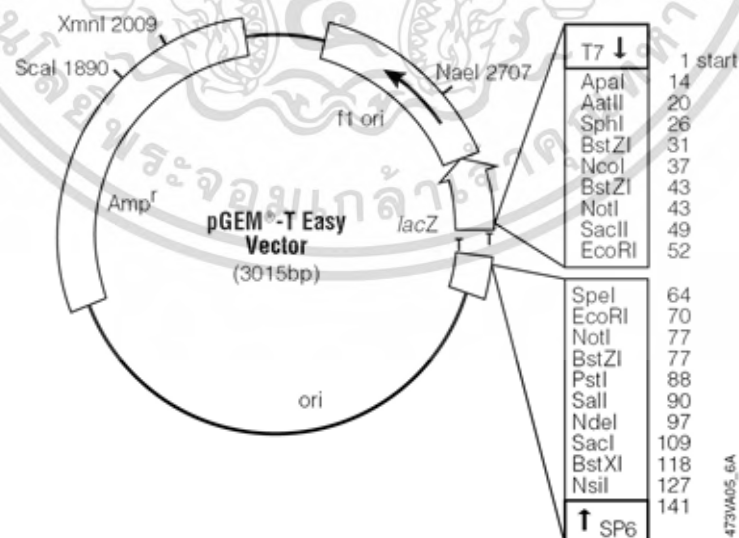
1. ในขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ สามารถทำได้ 2 แบบ แบบแรกคือการรัน PCR product ด้วย agarose gel จากนั้นตัดชิ้นส่วนเจลเฉพาะบริเวณที่ต้องการ ส่วนแบบที่สองคือนำสารละลาย PCR product มาทำให้บริสุทธิ์เลย โดยแบบแรกเมื่อตัดชิ้นส่วนเจล และนำไปละลายเจลที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 15 นาที spin down รวบรวมทั้งหมด ส่วนแบบที่สอง สามารถเติม GeL/PCR buffer 5 volume ต่อ PCR product 1 volume และทำขั้นตอนต่อไปได้เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ประกอบ column และ collection tube จากนั้นบีบเปิดสารละลายตัวอย่างใส่ column 800  $\mu\text{L}$  แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000  $\times\text{g}$  เป็นเวลา 30 วินาที ที่ตั้งสารละลายใน collection tube
3. เติม W1 buffer 400  $\mu\text{L}$  แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000  $\times\text{g}$  เป็นเวลา 30 วินาที ที่ตั้งสารละลายใน collection tube และเติม Wash buffer 600  $\mu\text{L}$  ตั้งทิ้งไว้ อุณหภูมิห้อง 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000  $\times\text{g}$  เป็นเวลา 30 วินาที ที่ตั้งสารละลายใน collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 11,000  $\times\text{g}$  เป็นเวลา 3 นาที
4. ย้าย column ไปหลอดทดลอง 1.5-mL จากนั้นเติม UP  $\text{H}_2\text{O}$  (ที่ผ่านการอุ่นให้ร้อน) ปริมาตร 20-50  $\mu\text{L}$  ลงใน column ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000  $\times\text{g}$  เป็นเวลา 2 นาที
5. นำ DNA ที่ได้มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified PCR product) ที่ได้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)

### 3.4.4 การ ligation

ทำการเชื่อม (ligation) ชิ้นส่วนของยีนกับ vector pGEM-T easy โดยแสดงดังภาพที่ 3.1 และใช้ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation แสดงดังตารางที่ 3.6 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (ข้ามคืน)



ภาพที่ 3.1 pGEM®-T Easy Vector (promega)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.6 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการทำ ligation

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μL)
Nuclease-free water	4.8
10X Rapid Ligation buffer	1
pGEM-T easy vector (50ng/ μL)	0.5
PCR product	2.7
T4 DNA ligase	1
Total Volume	10

### 3.4.5 การ Transformation

ทำการ Transformation และคัดเลือกด้วยเทคนิค blue-white screening

- นำ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ DH- $\alpha$ 5 มาเติมสารละลาย ligation mixture 5  $\mu$ L ที่เตรียมไว้ แล้ววางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
- นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42°C เวลา 1 นาที และนำไปแช่เย็นไว้บนน้ำแข็ง
- เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 900  $\mu$ L (แสดงในตารางที่ 3.7) แล้วนำไปเลี้ยงที่เครื่อง shaker อุณหภูมิ 37°C 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective media) สำหรับการทำ blue-white screening โดยนำยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin) Amp, X-gal, IPTG มาทำการ spread ลงบนอาหาร LB agar (แสดงในตารางที่ 3.8)
- นำเชื้อที่ปั๊มไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm เป็นเวลา 3 นาที เทอาหารออกบางส่วน นำอาหารที่เหลือมาละลายตะกอน และทำการ spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ และนำไปปั๊มที่ 37°C ซ้ำมคืน

ตารางที่ 3.7 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (g)
Yeast extract	0.5
Peptone	1
NaCl	1
H <sub>2</sub> O	100 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.8 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective media) สำหรับการคัดเลือกแบบ blue-white screening

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μL)
100 mg/ml Ampicillin	20
20 mg/ml X-gal	40
100mM IPTG	10
Sterile H <sub>2</sub> O	100

### 3.4.6 การคัดเลือก positive control ด้วยเทคนิค colony PCR

ทำการเลือกโคโลนี (colony) สีขาว มาตรวจสอบ positive clone ด้วยเทคนิค colony PCR และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

1. เตรียม 8-strip PCR tube ใส่ น้ำ UP H<sub>2</sub>O (sterile) หลอดละ 5 μL ทำการเลือกโคโลนีสีขาว 8 โคโลนีมาละลายใน 8-strip PCR tube โดยจะนำสารละลาย 1 μL มาเป็นแม่แบบในการทำ colony PCR

2. Colony PCR amplification โดยใช้ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และอุณหภูมิ แสดงดังตารางที่ 3.9 และตารางที่ 3.10 ตามลำดับ

3. ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)

4. เลือก positive colony มา 3 โคโลนี นำไปเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-Amp จากนั้นนำไปเลี้ยงที่ shaker อุณหภูมิ 37°C 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.9 แสดงส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μL)
UP H <sub>2</sub> O	20.15
10X PCR buffer	2.5
10 mM dNTPs mix	0.5
10 μM forward primer	0.375
10 μM reverse primer	0.375
Taq DNA polymerase	0.125
DNA template	1
Total volume	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.10 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	ทำซ้ำ
Initial Denaturation	94 °C	2 นาที	
Denaturation	94 °C	30 วินาที	
Annealing	58 °C	30 วินาที	30 รอบ
Extension	72 °C	1 นาที	
Final extension	72 °C	5 นาที	

### 3.4.7 Plasmid extraction โดย Presto™ Mini Plasmid Kit (Geneaid)

เมื่อได้ positive clone จะนำโคโลนีนั้นไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-amp ที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน สำหรับการสกัดพลาสมิด

- นำหลอดที่เลี้ยงเชื้อไว้ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 xg เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออก และละลายตะกอนด้วย PD1 buffer ปริมาตร 200  $\mu$ L
- ปิเปตสารละลายทั้งหมดใส่หลอดขนาด 1.5-mL ใส่ PD2 buffer ปริมาตร 200  $\mu$ L ทำให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา (invert) 10 ครั้ง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที
- ใส่ PD3 buffer ปริมาตร 300  $\mu$ L ทำให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา (invert) 10 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 10 นาที
- เตรียม PDH column ขนาด 2 mL จากนั้นปิเปตส่วนใสทั้งหมดประมาณ 700  $\mu$ L ลงใน PDH column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที และทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง
- ปิเปต W1 400  $\mu$ L ลง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาทีและทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง
- ปิเปต Wash buffer 600  $\mu$ L ลงใน column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้งและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg ต่ออีก 3 นาที จากนั้นนำ column ใส่หลอด 1.5-mL ใหม่
- ใส่ Elution buffer 35  $\mu$ L ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 2 นาที
- นำสารละลายพลาสมิดไปวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.8 การคัดเลือก positive clone ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจสอบ ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และนำพลาสมิดไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (ตามที่ได้ระบุไว้ใน หัวข้อ 3.4.2)

1. นำพลาสมิดที่สกัดได้มา cut check ด้วย restriction enzyme *EcoRI* โดยมีรายละเอียดตามตารางที่ 3.11 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ใน หัวข้อ 3.4.2)

ตารางที่ 3.11 แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการ cut check ด้วย restriction enzyme *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μL)
H <sub>2</sub> O	3.5
10X buffer	1
Plasmid	5
Enzyme	0.5
Total volume	10

### 3.4.9 การเพิ่มจำนวน DNA แม่แบบ สำหรับการนำไปผลิต dsRNA

นำพลาสมิดที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบ ในการเพิ่มจำนวน DNA ที่มีการต่อส่วนของ T7 promoter สำหรับการนำไปผลิตอาร์เอ็นเอสายคู่ หรือ dsRNA ด้วยเทคนิค PCR

1. นำพลาสมิดที่สกัดได้ มาเป็น DNA template ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอแม่แบบ สำหรับการสร้าง dsRNA โดยการนำไปเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR และใช้อุณหภูมิ ตามตารางที่ 3.12 และตารางที่ 3.13 ตามลำดับ
2. ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)
3. นำ PCR product มา PCR purification ด้วย GeneHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid) (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.3)
5. วัดความเข้มข้นของ purified PCR product ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.12 แสดงส่วนประกอบของสารเคมี ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μL)
UP H <sub>2</sub> O	41.25
10X PCR buffer	5
10 mM dNTPs mix	1
10 μM forward primer	0.75
10 μM reverse primer	0.75
Taq DNA polymerase	0.25
DNA template	1
Total volume	50

ตารางที่ 3.13 แสดงขั้นตอนการทำ PCR (PCR amplification)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	ทำซ้ำ
Initial Denaturation	94 °C	2 นาที	
Denaturation	94 °C	30 วินาที	
Annealing	58 °C	30 วินาที	30 รอบ
Extension	72 °C	1 นาที	
Final extension	72 °C	5 นาที	

#### 3.4.10 การสร้าง dsRNA ที่จำเพาะกับยีนรูปคอน (dsRUB)

1. ทำการสร้าง dsRUB ด้วยชุด T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA production system (Promega) ตามรายละเอียดที่ระบุในตารางที่ 3.14 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2. เติม RQ1 RNase-free DNase 1 μL และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 15 นาที

3. นำสารละลาย RNA หลอด sense และ anti-sense มารวมกันแล้วนำไป heat ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น 30 นาที

4. นำสารละลายดังกล่าว มาใส่ในหลอด 1.5-mL ใหม่ ใส่ 3M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 Volume และใส่ isopropanol ที่เย็น 1 Volume ผสมให้เข้ากันและ spin down

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วเติม 70% Ethanol ที่เย็น 500 μL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เทสารละลายทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารส่วนบุคคลที่จัดทำขึ้นเพื่อการเรียนการสอนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ใช้ปิเปตดูดสารละลาย ที่เหลือออกให้หมด และเปิดฝาดากตะกอน รอจนตะกอนเปลี่ยนสีจากสีขาวขุ่นไปเป็นสีใสใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที
7. เติมน้ำ DEPC เพื่อละลายตะกอน
8. วัดความเข้มข้น dsRUB ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ตามรายละเอียดที่ระบุในหัวข้อ 3.4.2)

**ตารางที่ 3.14** แสดงส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการสร้าง dsRNA ด้วยชุด T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA production system (Promega)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μL)
RiboMAX™ Express T7 2X Buffer	10
linear DNA template (1μg)	1-8
Nuclease-Free Water	0-7
Enzyme Mix, T7 Express	2
Total volume	20

### 3.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsRUB ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอนในกิ้ง

ในการทดลองนี้จะแบ่งกิ้งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กิ้งที่ฉีดด้วย dsGFP ซึ่ง dsGFP ไม่จำเพาะกับยีนในกิ้ง เป็นกลุ่มควบคุม และ 2) กิ้งที่ฉีดด้วย dsRUB เป็นกลุ่มทดลอง โดยจะทำการตรวจหาความเข้มข้นของ dsRNA ที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอนในกิ้งได้ ซึ่งจะใช้ 3 ความเข้มข้นคือ 0.5 1 และ 2.5 μg ต่อกรัมกิ้ง ในการทดลองนี้จะใช้กิ้งขาวสุขภาพดี ขนาด 2-3 กรัม เริ่มจากการฉีดสารละลาย dsRNA หลังจากฉีด dsRNA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะทำการเก็บตัวอย่างเห็อกนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.2) จากนั้นวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer และนำไปสร้าง first-strand cDNA (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.3) ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsRUB ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอนด้วยเทคนิค qPCR (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.2)

### 3.6 การศึกษาบทบาทของยีนรูปคอนในกิ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

#### 3.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอน และยีนไวรัส VP28 ในกิ้ง

ในการทดลองนี้ได้แบ่งกิ้งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก กิ้งที่ถูกฉีดด้วย dsGFP และกลุ่มที่สอง คือกิ้งที่ถูกฉีดด้วย dsRUB โดยจะฉีด dsRNA ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g}$  ต่อกรัมกิ้ง หลังจากฉีด dsRNA 24 ชั่วโมง จะฉีดสารละลายไวรัสตัวแดงดวงขาว ทำการเก็บตัวอย่างกิ้ง (เหงือกและเลือด) หลังติดไวรัสที่เวลา 24 30 และ 48 ชั่วโมงนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.2) จากนั้นวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer และนำไปสร้าง first-strand cDNA (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.3.3) ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปคอน และยีนไวรัส VP28 ด้วยเทคนิค qPCR (ตามที่ได้ระบุไว้ในหัวข้อ 3.2)

#### 3.6.2 การบันทึกอัตราการตายของกิ้ง

ทำการบันทึกอัตราการตายของกิ้งกลุ่มตัวอย่างตามที่ระบุในข้อ 3.6.1 หลังจากฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 9 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลการทดลอง

#### 3.6.3 การตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number)

ทำการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number) ในกลุ่มตัวอย่างที่ระบุในข้อ 3.6.1 โดยเริ่มจากการเก็บเหงือกมาสกัด genomic DNA (ตามรายละเอียดที่ระบุในหัวข้อ 3.6.3.1) เนื่องจากไวรัสจะเพิ่มจำนวนได้ดีที่เหงือก จึงทำการเก็บเหงือกมาสกัด genomic DNA จากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณไวรัส เทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ด้วยเทคนิค qPCR (ตามรายละเอียดที่ระบุในหัวข้อ 3.6.3.2) และทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง

##### 3.6.3.1 การสกัด genomic DNA

1. ตัดตัวอย่างเหงือกกิ้ง ใส่หลอด 1.5-mL เติม FATG1 buffer ปริมาตร 200  $\mu\text{L}$  และทำการบดให้เป็นเนื้อเดียว
2. เติม Proteinase K (10mg/mL) ปริมาตร 20  $\mu\text{L}$  และทำให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. จากนั้นเติม FATG2 Buffer ปริมาตร 200  $\mu\text{L}$  และทำให้เข้ากันโดย vortex และนำไปต้ม 70°C เป็นเวลา 10 นาที
4. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ปิดเตาสารละลายส่วนใสไปใส่หลอด 1.5-mL ใหม่
5. เติม ethanol 200  $\mu\text{L}$  และทำให้เข้ากันโดยการ vortex และ spin down
6. ประกอบ Column ปิดเตาสารละลายทั้งหมดใส่ Column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และเทสารละลายใน collection tube ที่
7. เติม W1 Buffer 400  $\mu\text{L}$  และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 xg เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ทางออนไลน์โดยไม่คิดค่าใช้จ่าย การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ขออนุญาตให้โทษแก่ผู้ใช้งานและผู้เผยแพร่เอกสารนี้ ไม่สามารถฟ้องร้องดำเนินคดีได้

8. เติม Wash Buffer 750  $\mu\text{L}$  นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาทีและเทสารละลายใน collection tube ที่ จากนั้นทำการ air dry column โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 3 นาที

9. เติม Elution buffer 100  $\mu\text{L}$  โดยหยดลงตรงกลาง column ที่ไว้ 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 xg เป็นเวลา 2 นาที เพื่อ elute genomic DNA

10. นำไปวัดความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis (ตามรายละเอียดที่ระบุในข้อ 3.4.2)

#### 3.6.4.2 quantitative PCR

สร้าง standard curve ที่มีปริมาณไวรัส  $10^3$ - $10^7$  viral copies จากนั้นนำตัวอย่าง gDNA ที่ความเข้มข้นเท่า ๆ กันมาตรวจสอบหาปริมาณไวรัสด้วยเทคนิค qPCR โดยทำการเตรียมหลอด 1.5-mL ทั้งหมด 8 หลอด หลอดที่ 1 ปรับความเข้มข้นพลาสมิด 10 ng/ $\mu\text{L}$  ให้ได้ 1.88 ng/ $\mu\text{L}$  โดยต้องการปริมาตร 20  $\mu\text{L}$  จึงใส่พลาสมิด 3.8  $\mu\text{L}$  และเติม UP H<sub>2</sub>O 16.24  $\mu\text{L}$  ส่วนหลอดที่ 2 ถึง 8 ใส่พลาสมิด 2  $\mu\text{L}$  และเติม UP H<sub>2</sub>O 18  $\mu\text{L}$  จากนั้นจะนำไปทำ qPCR ตามรายละเอียดที่ระบุในตารางที่ 3.15 โดยใช้ข้อมูลภูมิตามรายละเอียดที่ระบุในตาราง 3.2

ตารางที่ 3.15 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร ( $\mu\text{L}$ )
Luna qPCR mix enzyme (NEB)	5
10 $\mu\text{M}$ forward primer	0.15
10 $\mu\text{M}$ reverse primer	0.15
UP H <sub>2</sub> O	3.7
Standard plasmid	1
Total Volume (master mix= 9 $\mu\text{L}$ )	10

นำ gDNA จากเหือกกึ่งที่สกัดได้จากข้อ 3.6.3.1 มาทำการปรับความเข้มข้นให้ได้ 100 ng/ $\mu\text{L}$  ด้วย UP H<sub>2</sub>O สำหรับตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number) โดยเตรียมส่วนประกอบสำหรับการทำ qPCR ตามรายละเอียดที่ระบุในตารางที่ 3.16 และใช้ข้อมูลภูมิตามรายละเอียดที่ระบุในตาราง 3.2

ตารางที่ 3.16 แสดงส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา qPCR (PCR reaction)

ส่วนประกอบ	ปริมาตร ( $\mu\text{L}$ )
Luna qPCR mix enzyme (NEB)	5
10 $\mu\text{M}$ forward primer	0.15
10 $\mu\text{M}$ reverse primer	0.15
UP H <sub>2</sub> O	3.7
gDNA template	1
Total Volume (master mix = 9 $\mu\text{L}$ )	10

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย T-test dependent ผ่านโปรแกรม GraphPad Prism ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

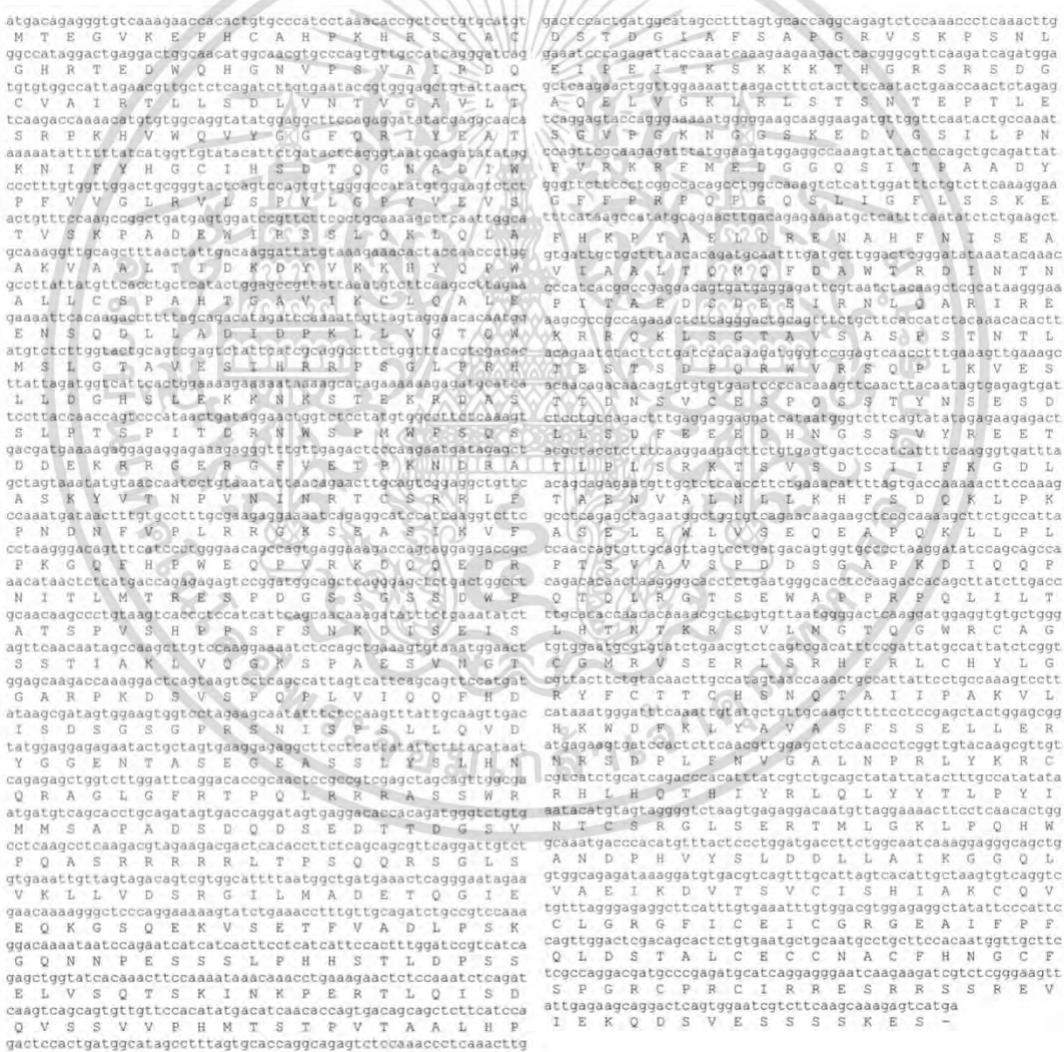
# บทที่ 4

## ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

### 4.1 การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม

#### 4.1.1 การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของรูบิคอนในกุ้ง *P. vannamei* ผ่านฐานข้อมูล NCBI พบว่ามี accession number XM\_027359602.1 และมี open reading frame ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 3,708 bp ซึ่งสามารถ translate เป็น 1,235 amino acid (แสดงดังภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของรูบิคอนของกุ้งขาว *Penaeus vannamei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.1.2 การทำนาย conserved domain

จากการนำลำดับกรดอะมิโนของรูบิคอนมาทำนาย conserved domain ด้วยโปรแกรม SMART พบว่ามี 1 conserved domain คือ RUN domain ที่ลำดับกรดอะมิโน 126-189 (แสดงดังภาพที่ 4.2) RUN domain ถูกระบุว่าเป็นหน่วยย่อย PI3KC3 ผ่านการเชื่อมโยงกับ Beclin-1 ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการทำงานของรูบิคอน ในการยับยั้งกิจกรรมของ PI3KC3 lipid kinase และกระบวนการออโตฟาจี

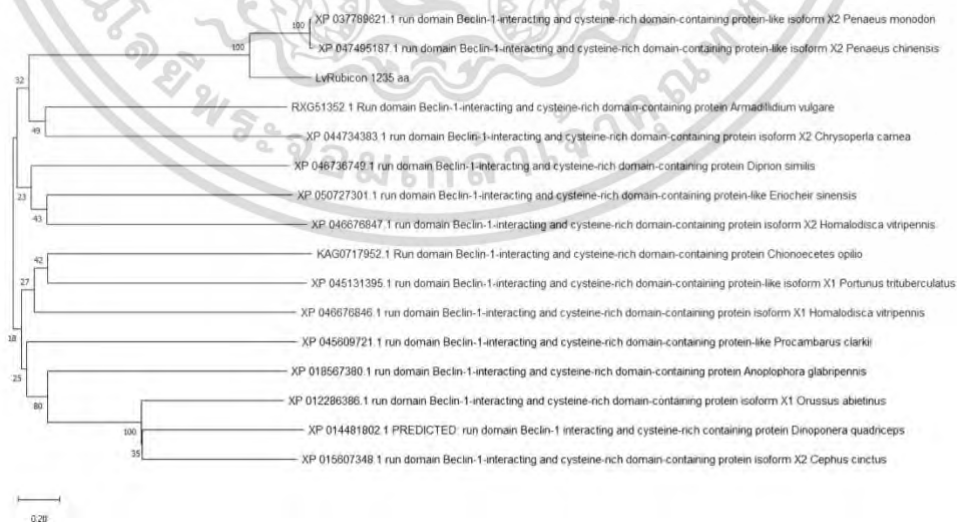
จากงานวิจัยที่ผ่านมาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่ามี 2 conserved domain คือ RUN domain ที่ลำดับกรดอะมิโน 48-189 และ coiled-coil domain (CCD) ที่ลำดับกรดอะมิโน 505-557 (Yang et al., 2012) เป็นโดเมนที่สำคัญในการจับกันของ Beclin-1 และ p22phox ซึ่ง Beclin-1 มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการทำงานของรูบิคอน ในการยับยั้งกระบวนการออโตฟาจี



ภาพที่ 4.2 การทำนาย conserved domain ของโปรตีนรูบิคอน

### 4.1.3 การสร้าง phylogenetic tree

จากแผนภูมิความสัมพันธ์ของรูบิคอน พบว่าสามารถจัดกลุ่มตาม phylum ได้คือ Arthropoda (แสดงดังภาพที่ 4.3) โดยรูบิคอนของกุ้งขาว *P. vannamei* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับพวก Arthropoda ซึ่งมีความใกล้เคียงกับรูบิคอนของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* มากที่สุด พบว่ามี % identity = 96.0% และ % similarity = 97.6%



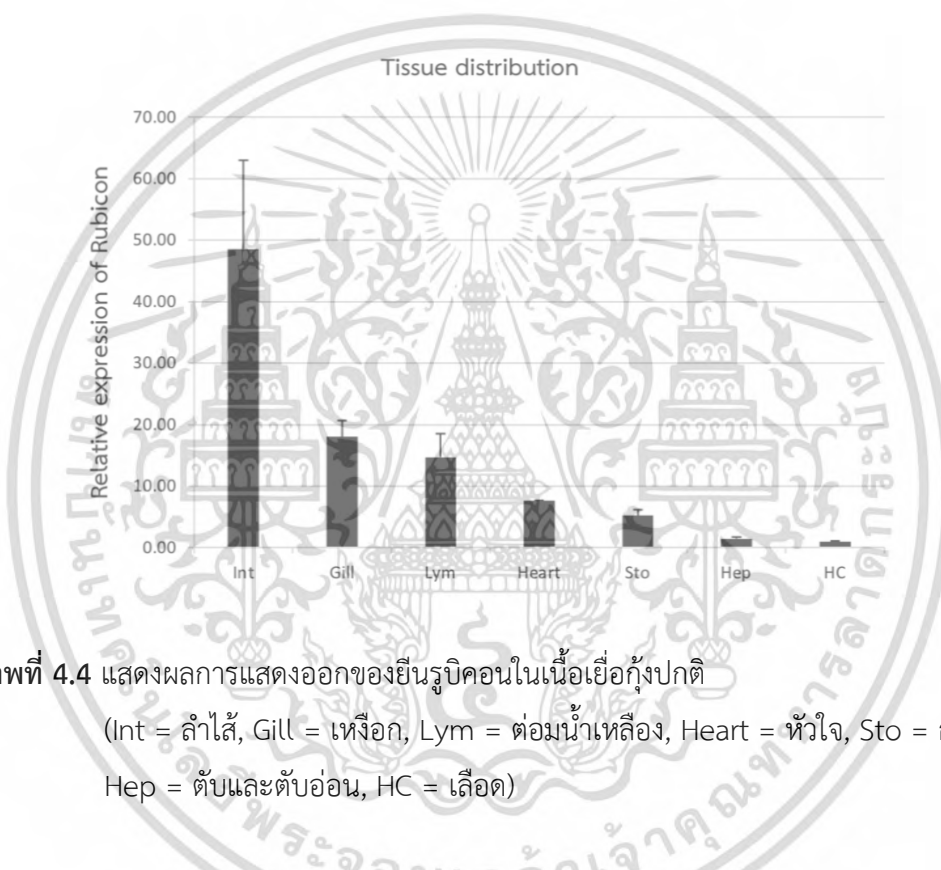
ภาพที่ 4.3 แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโปรตีนรูบิคอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในเนื้อเยื่อต่างๆ

จากกราฟแสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในเนื้อเยื่อต่างๆ พบว่ายีนรูบิคอนมีการแสดงออกมากที่สุดใน ลำไส้ (Intastine) ตามด้วยเหงือก (Gill) ต่อมมน้ำเหลือง (Lymphoid organ) หัวใจ (Heart) กระเพาะ (Stomach) ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) แสดงน้อยที่สุดในเลือด (Hemocyte) (แสดงในภาพที่ 4.4)

แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมา การแสดงออกของยีนรูบิคอนในหนู หลังติดเชื้อ *C. albicans* ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในตับ ม้าม ไต และปอด พบว่ายีนรูบิคอนแสดงออกมากที่สุดในตับและตับอ่อน (Yang et al., 2012)



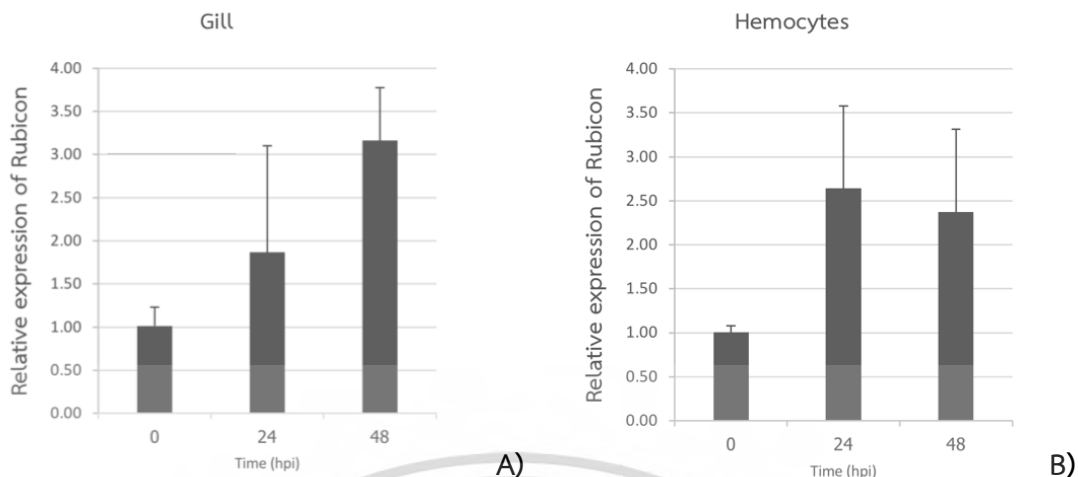
ภาพที่ 4.4 แสดงผลการแสดงออกของยีนรูบิคอนในเนื้อเยื่อต่างๆ

(Int = ลำไส้, Gill = เหงือก, Lym = ต่อมมน้ำเหลือง, Heart = หัวใจ, Sto = กระเพาะ, Hep = ตับและตับอ่อน, HC = เลือด)

## 4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในกึ่งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าหลังจากกึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 24 และ 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่ายีนรูบิคอน มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเทียบกับเวลาการติดเชื้อที่ 0 ชั่วโมง (แสดงในภาพที่ 4.5) จึงสามารถสรุปได้ว่ายีนรูบิคอนมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น เมื่อกึ่งติดโรคตัวแดงดวงขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การแสดงออกของยีนรูบิคอน เมื่อติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

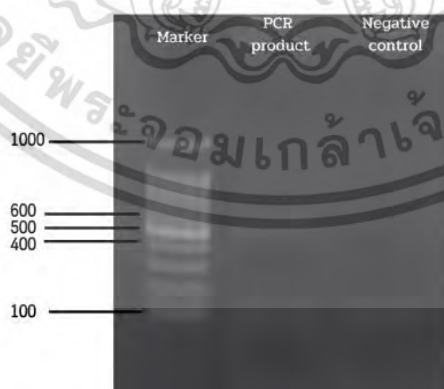
A: การแสดงออกของยีนรูบิคอนในเหงือก (Gill) กุ้งหลังติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

B: การแสดงออกของยีนรูบิคอนในเลือด (Hemocyte) กุ้งหลังติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

#### 4.4 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีนรูบิคอน

##### 4.4.1 การเพิ่มจำนวนยีนรูบิคอนด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

จากการเพิ่มจำนวนยีนรูบิคอน ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA ของกุ้งขาวเป็นแม่แบบ และนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 550 bp (แสดงในภาพที่ 4.6) ซึ่งตรงกับขนาดของชิ้นยีนรูบิคอนตามคู่ primer ที่ได้ออกแบบไว้ จากนั้นนำไปตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพด้วย nanodrop spectrophoresis ได้ผลตามตารางที่ 4.1

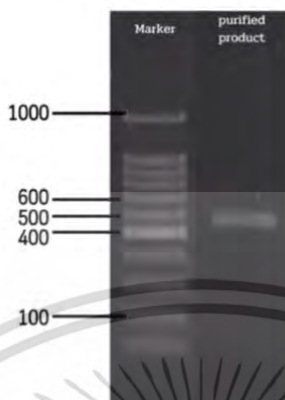


ภาพที่ 4.6 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ PCR product ของยีนรูบิคอนด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.2 การทำขั้่นยึ่นรูปคองให้บริสุทธิ์ (purification of PCR product)

จากผลการทำขั้่นยึ่นรูปคองให้บริสุทธิ์ และนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าขั้่น purified รูปคองมีขนาดประมาณ 550 bp



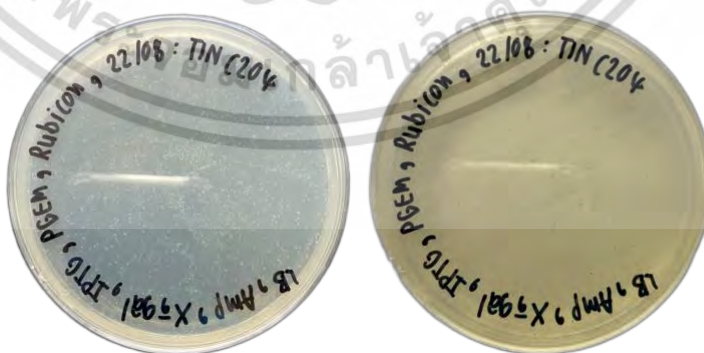
ภาพที่ 4.7 แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพของ purified PCR product ของขั้่นยึ่นรูปคองด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 4.1 ผลการวัดความขั้่นขั้่น purified PCR product ด้วย nanodrop spectrophotometer

	ความขั้่นขั้่น (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
purified-RUB	8.5	1.36	1.34

#### 4.4.3 การคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค blue-white screening

จากผลการคัดเลือกด้วยเทคนิค blue-white screening จะเห็นว่ามีทั้งโคโลนีสีขาวและสีฟ้า (แสดงในภาพที่ 4.8) ซึ่งจะนำโคโลนีสีขาวไปทำการตรวจสอบต่อไป

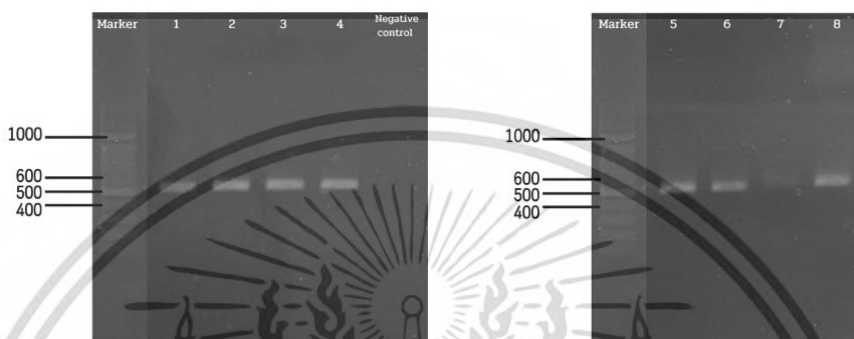


ภาพที่ 4.8 แสดงผลการคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค blue white screening

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.4 การคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค colony PCR

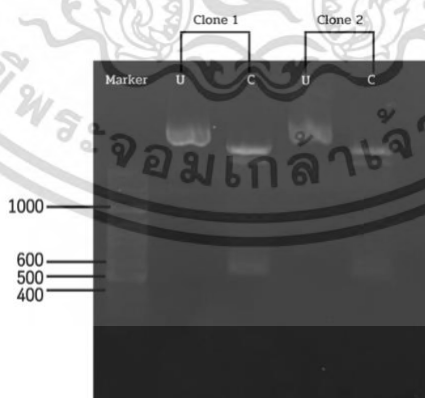
จากการนำโคลนีสีขาวมาเป็นแม่แบบในการทำ PCR และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ผลการทดลองพบ PCR product ขนาดประมาณ 550 bp ทุกโคลน (แสดงในภาพที่ 4.9) ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนของยีนรูบิคอน จากนั้นเลือก 3 โคลน คือ โคลนที่ 2 3 และ 4 โดยนำโคลนที่เลือกมาไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-amp ข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) แล้วเลือกเชื้อจากโคลนที่ 2 และ 4 มาสกัด plasmid ต่อไป



ภาพที่ 4.9 แสดงผลการคัดเลือกโคลน จากการทำ colony PCR และตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

#### 4.4.5 การคัดเลือกโคลนโดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *EcoRI*

นำพลาสมิดที่สกัดได้ (จากตารางที่ 4.2) มาทำการ cut check ด้วย restriction enzyme *EcoRI* พบว่ามี PCR product ขนาด 550 bp (แสดงในภาพที่ 4.10) เพราะเอนไซม์ *EcoRI* ตัดขึ้นยีนรูบิคอน ที่ใส่เข้าไปในเวกเตอร์ pGEM-T easy ทำให้เกิด PCR product ขนาด 550 bp จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า สามารถสร้างพลาสมิด pGEM-T/Rubicon ได้



ภาพที่ 4.10 แสดงผลการตรวจสอบการคัดเลือกด้วยการใช้ *EcoRI* ด้วยเทคนิค Agarose gel

Electrophoresis ; lane 1 un cut pGEM-T/Rubicon no.1, lane 2 cut pGEM-T/Rubicon no.1, lane 3 un cut pGEM-T/Rubicon no.2, lane 4 cut pGEM-T/Rubicon no.2

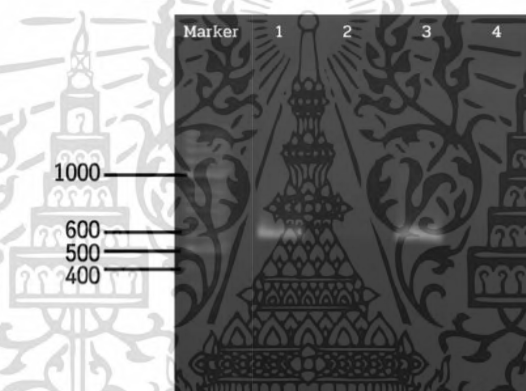
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วย nanodrop spectrophotometer

	ความเข้มข้น (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
pGEM-T/Rubicon no.1	324.8	1.88	2.19
pGEM-T/Rubicon no.2	220.3	1.86	2.16

#### 4.4.6 การเพิ่มจำนวนยีนรูบิคอน และต่อ T7 promoter ด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

จากการเพิ่มจำนวนยีนรูบิคอนด้วย primer ที่มีส่วนของ T7 promoter ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ pGEM-T/Rubicon เป็นแม่แบบ เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่า PCR product มีขนาดประมาณ 550 bp (แสดงในภาพที่ 4.11) ซึ่งคาดว่า เป็นยีนรูบิคอนที่มีส่วนของ T7 promoter

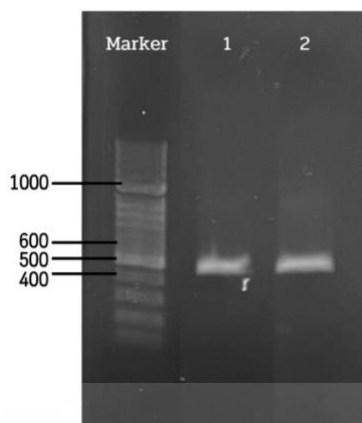


ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจสอบ PCR Product ของยีนรูบิคอนที่มีส่วนของ T7 promoter ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ; lane 1 PCR product Rubicon (primer T7F/R), lane 2 Negative control (primer T7F/R), Lane 3 PCR product Rubicon (primer F/T7R), Lane 4 Negative control (primer F/T7R)

#### 4.4.7 การทำชั้นยีนรูบิคอนที่มีส่วนของ T7 promoter ให้บริสุทธิ์ (purification of PCR product)

จากผลการทำชั้นยีนรูบิคอนให้บริสุทธิ์ และนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าชั้น purified รูบิคอนมีขนาดประมาณ 550 bp (แสดงในภาพที่ 4.12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



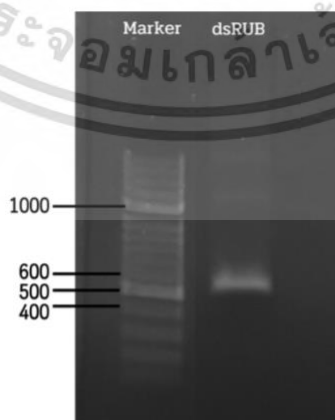
ภาพที่ 4.12 แสดงผลการตรวจสอบชิ้นยีน purified Rubicon-T7F/R และ Rubicon-F/T7R ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ; lane 1 purified Rubicon-T7F/R, lane 2 purified Rubicon-F/T7R

ตารางที่ 4.3 ผลการวัดความเข้มข้น purified PCR product ของชิ้นยีนรูบิคอนที่ต่อด้วย T7 promoter ด้วย nanodrop spectrophotometer

	ความเข้มข้น (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
Rubicon-T7F/R	164.4	1.81	2.10
Rubicon-F/T7R	151.9	1.76	2.13

#### 4.4.8 การสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีนรูบิคอน หรือ dsRUB

จากการสร้าง dsRUB ด้วยด้วยชุด T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA production system (Promega) และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis พบชิ้นยีนขนาดประมาณ 550 bp (แสดงในภาพที่ 4.13) และเมื่อตรวจสอบความเข้มข้นด้วย nanodrop spectrophotometer พบว่ามีความเข้มข้น 58.4 ng/ $\mu$ L



ภาพที่ 4.13 แสดงผลการตรวจสอบ dsRUB ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการวัดความเข้มข้น dsRUB ด้วย nanodrop spectrophotometer

	ความเข้มข้น (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
dsRUB	58.4	2.02	2.19

ความเข้มข้นของ dsRNA สำหรับฉีดกุ้ง

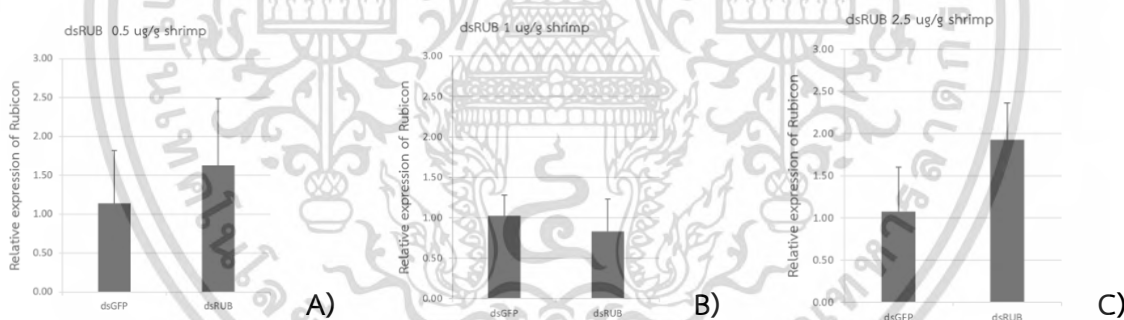
Diluted dsRUB 54.8 ng/ $\mu$ L

ความเข้มข้น dsRUB = 54.8 X dilution factor 50

= 2.74  $\mu$ g/  $\mu$ L

#### 4.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ dsRUB ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปิคอนในกุ้ง

จากผลการทดลอง พบว่ากุ้งกลุ่มที่ฉีด dsRUB ที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2.5  $\mu$ g ต่อกรัมกุ้ง ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปิคอนได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม คือกุ้งที่ฉีดด้วย dsGFP (แสดงในภาพที่ 4.14) จากผลการทดลองนี้จึงทำการฉีด dsRUB ในกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่า กุ้งกลุ่มที่ฉีด dsRUB ในกุ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปิคอนได้ (แสดงในภาพที่ 4.15)



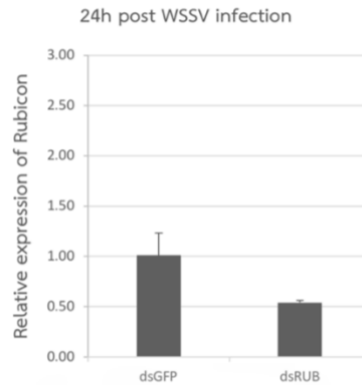
ภาพที่ 4.14 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูปิคอนในกุ้ง เมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปิคอนด้วย dsRUB

A: การแสดงออกของยีนรูปิคอนในกลุ่มที่ฉีด dsRUB ที่ความเข้มข้น 0.5  $\mu$ g ต่อกรัมกุ้ง

B: การแสดงออกของยีนรูปิคอนในกลุ่มที่ฉีด dsRUB ที่ความเข้มข้น 1  $\mu$ g ต่อกรัมกุ้ง

C: การแสดงออกของยีนรูปิคอนในกลุ่มที่ฉีด dsRUB ที่ความเข้มข้น 2.5  $\mu$ g ต่อกรัมกุ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

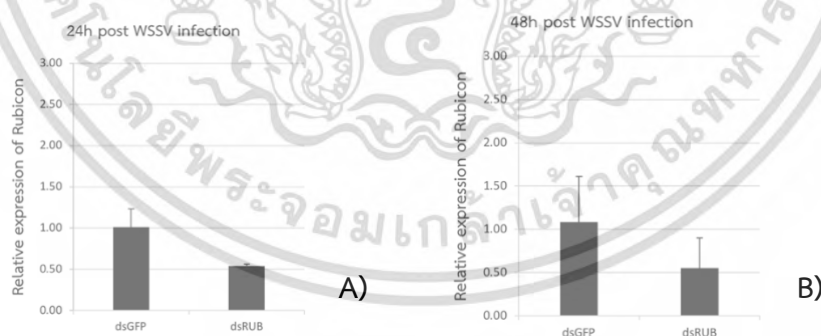


ภาพที่ 4.15 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวเมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอนด้วย dsRUB

#### 4.6 การศึกษาบทบาทของยีนรูบิคอนในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

##### 4.6.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอน และยีนไวรัส VP28

เริ่มจากการศึกษาบทบาทของยีนรูบิคอนในเหงือกกุ้ง จากผลการทดลองพบว่า หลังติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในเหงือกกุ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอนด้วย dsRUB มีการแสดงออกของยีนรูบิคอนลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.16) และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไวรัส VP28 ซึ่งเป็นยีนที่พบมากที่สุดไวรัสตัวแดงดวงขาว จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หลังการติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในเหงือกกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอน พบว่าการแสดงออกของยีน VP28 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.17)

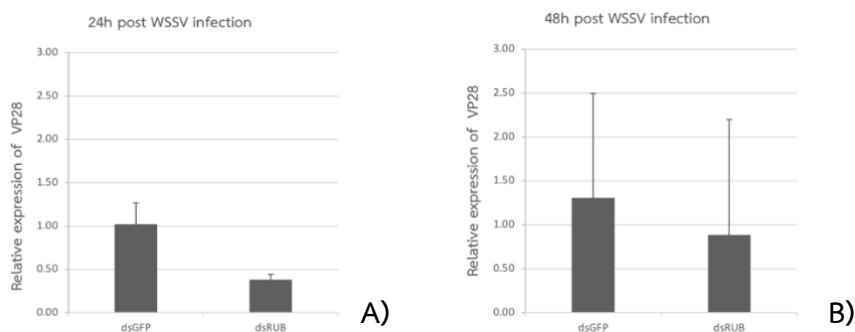


ภาพที่ 4.16 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอน ในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

A: การแสดงออกของยีนรูบิคอนในกลุ่มที่ฉีด dsRUB หลังจากติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง

B: การแสดงออกของยีนรูบิคอนในกลุ่มที่ฉีด dsRUB หลังจากติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

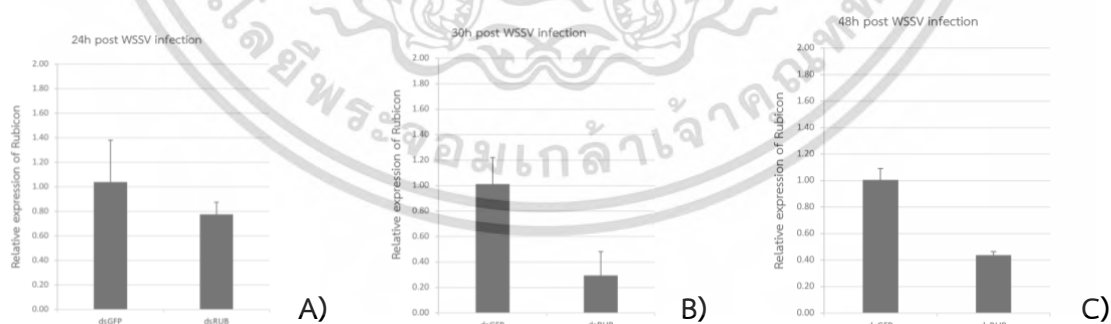


ภาพที่ 4.17 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

A: การแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอน หลังจากติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง

B: การแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอน หลังจากติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 48 ชั่วโมง

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษายาทาของยีนรูบิคอนในเลือดของกุ้งด้วย โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 30 และ 48 ชั่วโมง และตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอน ด้วยเทคนิค qPCR พบว่าหลังการติดโรคตัวแดงดวงขาวที่ 24 30 และ 48 ชั่วโมง ในเลือดกุ้งที่ถูกฉีดด้วย dsRUB มีการแสดงออกของยีนรูบิคอนลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.18) และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในเลือดของกุ้ง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่ 30 และ 48 ชั่วโมง หลังการติดโรคตัวแดงดวงขาว ในกุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอน พบว่าการแสดงออกของยีน VP28 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังการติดโรคตัวแดงดวงขาว การแสดงออกของยีน VP28 ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.19)



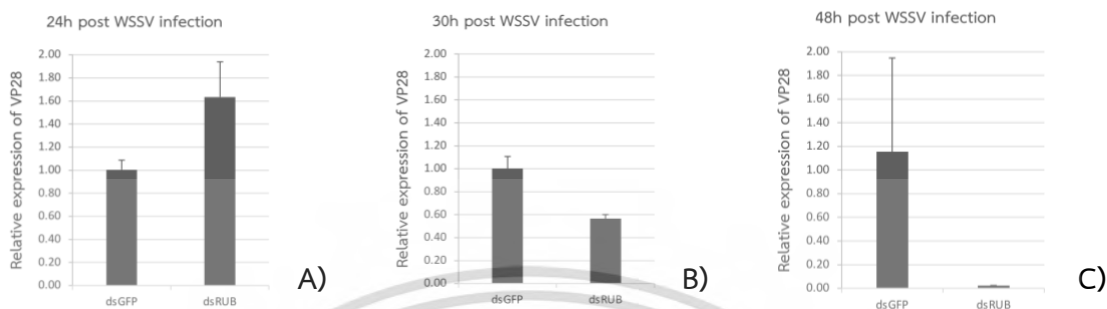
ภาพที่ 4.18 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอน ในเลือดกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

A: การแสดงออกของยีนรูบิคอนในกลุ่มที่ฉีด dsRUB หลังการติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง

B: การแสดงออกของยีนรูบิคอนในกลุ่มที่ฉีด dsRUB หลังการติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 30 ชั่วโมง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่เปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C: การแสดงออกของยีนรูบิคอนในกลุ่มที่ฉีด dsRUB หลังจากติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.19 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP28 ในเลือดกิ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว

A: การแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกิ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอน หลังจากติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 24 ชั่วโมง

B: การแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกิ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอน หลังจากติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 30 ชั่วโมง

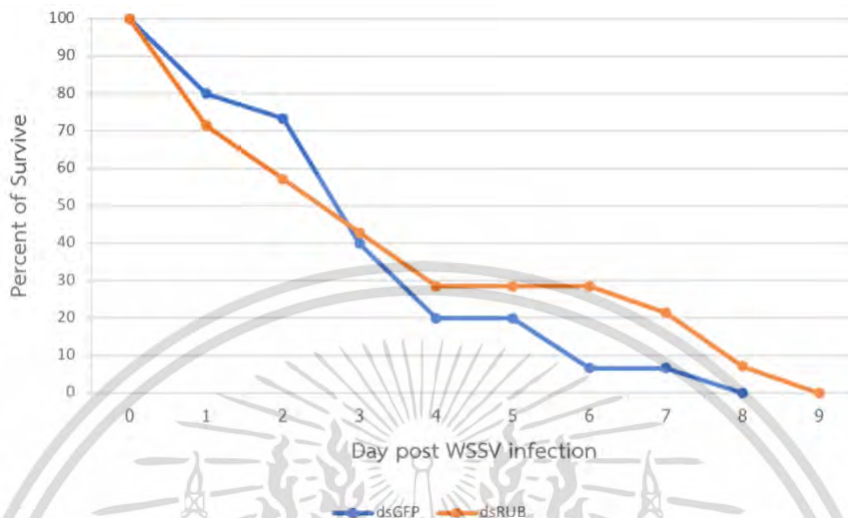
C: การแสดงออกของยีน VP28 ในเหงือกกิ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอน หลังจากติดโรคตัวแดงดวงขาวที่เวลา 48 ชั่วโมง

#### 4.6.2 การติดตามอัตราการตายของกิ้ง

จากการติดตามอัตราการตายสะสมของกิ้งที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ทั้งในกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอนและกลุ่มควบคุมทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 9 วัน พบว่าในช่วง 1-3 วันแรก กิ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของรูบิคอน มีอัตราการตายมากกว่ากิ้งกลุ่มควบคุม แต่หลังจากวันที่ 4 เป็นต้นไป พบว่ากิ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอน มีอัตราการตายช้ากว่ากิ้งกลุ่มควบคุม (แสดงในภาพที่ 4.20) โดยพบว่ากิ้งกลุ่มควบคุมจะตาย 100% ที่วันที่ 8 หลังจากติดเชื้อไวรัส และกิ้งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอนจะตาย 100% ที่วันที่ 9 หลังจกติดเชื้อ ดังนั้นการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่ากิ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอนจะทำให้กิ้งตายช้ากว่ากิ้งกลุ่มควบคุม

จากงานวิจัยศึกษาการแสดงออกของรูบิคอน ที่ส่งผลต่อการตอบสนองของเซลล์โฮสต์ในร่างกายนต่อการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A โดยใช้ Rubicon adenoviruses และหนูที่ติดไวรัส พบว่า หนูกลุ่มควบคุมจะมีอัตราการตายอยู่ที่ 5 วัน หลังติดไวรัส หนูที่มีการแสดงออกของรูบิคอน Ad-Rubicon มีอัตราการตายอยู่ที่ 4 วัน และหนูกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของรูบิคอน Ad-shRubicon มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น 30% เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อ Ad-vector ซึ่งหนูที่มีการแสดงออกของรูบิคอน จะมีปริมาณไวรัสในปอดสูงกว่า 100 เท่า และหนูที่ถูกยับยั้งการ

แสดงออกของรูปคอน จะมีปริมาณไวรัสในปอดต่ำกว่า 100 เท่า เมื่อเทียบกับหนูกุ่มควบคุม (Yang et al., 2012) ผลการทดลองนี้จะสอดคล้องกับผลติดตามอัตราการตายของกึ่งที่กล่าวมาข้างต้น



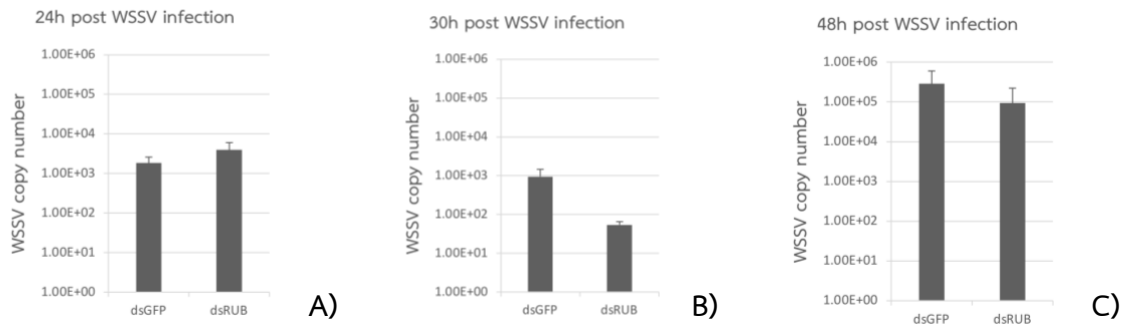
ภาพที่ 4.20 แสดงอัตราการตายของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอนด้วย dsRUB เทียบกับกึ่งกลุ่มควบคุม

#### 4.6.3 การตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว

จากผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่เวลา 24 30 และ 48 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 30 ชั่วโมง หลังติดเชื้อตัวแดงดวงขาว กึ่งกลุ่มที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอนมีปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวน้อยกว่ากึ่งกลุ่มควบคุม แต่ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวไม่ต่างกัน (แสดงในภาพที่ 4.21) เนื่องจากไวรัสจะกระตุ้นการแสดงออกของยีนรูปคอนเมื่อติดเชื้อที่เวลาเพิ่มขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งยีนรูปคอนลดลง อาจจะต้องทำการฉีดอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีนรูปคอนซ้ำ หรือฉีดในปริมาณที่มากขึ้น เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนรูปคอน

จากงานวิจัยที่ผ่านมา การศึกษาการแสดงออกของยีนรูปคอนในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) พบว่าเมื่อรูปคอนมีการแสดงออกมากขึ้น จะช่วยเพิ่มปริมาณไวรัสได้ ในทางตรงกันข้าม เมื่อยับยั้งการแสดงออกของรูปคอน จะทำให้ปริมาณไวรัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Wan et al., 2017) งานวิจัยนี้จึงสอดคล้องกับผลการทดลองตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวที่กล่าวมาข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.21 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number) ในกุ้งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาว

A: แสดงผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาวที่ 24 ชั่วโมง

B: แสดงผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาวที่ 30 ชั่วโมง

C: แสดงผลการตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งหลังติดโรคตัวแดงดวงขาวที่ 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการค้นหาและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของยีนรูบิคอนในกุ้งขาว พบว่ามี accession number XM\_027359602.1 โดยมี open reading frame ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 3,708 bp สามารถ translate เป็น 1,235 amino acid หลังจากทำนาย conserved domain พบว่ามี RUN domain ที่ลำดับกรดอะมิโน 126-189 เมื่อสร้าง Phylogenetic tree พบว่ายีน Rubicon ของกุ้งขาวมีความใกล้เคียงกับยีนรูบิคอนของกุ้ง *Penaeus mondon* มากที่สุด จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอนในเนื้อเยื่อของกุ้งปกติ พบว่ายีนรูบิคอนมีการแสดงออกมากที่สุดในลำไส้ (intestine) และทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนรูบิคอน ในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว พบว่ายีนรูบิคอนมีการแสดงออกมากขึ้นทั้งในเลือดและในเหงือกกุ้ง จากผลการทดลองนี้พบว่า การแสดงออกของยีนรูบิคอนมีความเกี่ยวข้องกับการติดโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ดังนั้นจึงทำการศึกษาบทบาทของยีนรูบิคอนในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค RNA interference พบว่าอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะกับยีนรูบิคอนหรือ dsRUB ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อกรัมกุ้ง สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอนได้ เมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอนในกุ้งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาวพบว่า มีการแสดงออกของยีนไวรัส VP28 ลดลง และเมื่อตรวจสอบปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV copy number) พบว่าหลังกุ้งติดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ 30 ชั่วโมง มีปริมาณไวรัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และจากการตรวจสอบอัตราการตาย พบว่าในช่วง 1-3 วันแรก กุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของรูบิคอน มีอัตราการตายมากกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม แต่หลังจากวันที่ 4 เป็นต้นไป พบว่ากุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอน มีอัตราการตายช้ากว่ากุ้งกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนรูบิคอนจะทำให้กุ้งตายช้ากว่ากุ้งกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่า ระดับการแสดงออกของยีนรูบิคอนมีความเกี่ยวข้องในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้ง ซึ่งการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของยีนรูบิคอนหลังติดไวรัสตัวแดงดวงขาว อาจเกิดมาจากการเหนี่ยวนำของไวรัส จึงคาดว่ายีนรูบิคอนมีความเกี่ยวข้องในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้ง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองพบว่า มีบางการทดลองยังต้องทำการทดลองซ้ำ โดยการเพิ่มจำนวนสัตว์ทดลอง (กึ่ง) เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการคำนวณทางสถิติ แต่จากผลการทดลองที่ได้แสดงข้างต้น ก็สามารถสรุปแนวโน้ม บทบาทของรูบิคอน ในกึ่งที่ติดโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำงานวิจัยต่อไปได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- Alvers, A. L. et al. 2009. Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin. *Autophagy* 5: 847–849.
- Biju, V.N. and Gunalan, B. 2016. Prevalence of vibrio infection in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* farms. *Science Inventions today*. 5: 485-493.
- Bondad-Reantaso, M.G., McGladdery, S.E., East, I., and Subasinghe, R.P. 2001. Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases, FAO. Fisheries Technical Paper. 402: 178-183.
- Blommaert, E.F., Luiken, J.J., Blommaert P.J., Woerkom, G.M. and Meier, A.J. 1995. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 2320–2326.
- Castel, S.E., and Martienssen, R.A. 2013. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond, *Nature reviews genetics*. 14: 100–112.
- Chou, H.-Y.Y., Huang, C.-Y.Y., Wang, C.-H.H., Chiang, H.-C.C. and Lo, C.-F.F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White Spot Syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23: 165–173.
- Chen, R.Y., Shen, K.L., Chen, Z., Fan, W.W., Xie, X.L., Meng, C., Chang, X.J., Zheng, L.B., Jeswin, J., Li, C.H., Wang, K.J., Liu, H.P. 2016. White spot syndrome virus entry is dependent on multiple endocytic routes and strongly facilitated by Cq-GABARAP in a CME-dependent manner. *Scientific Reports*. 6: 28694.
- Delgado, M., Singh, S., De Haro, S., Master, S., Ponpuak, M., Dinkins, C., Ornatowski, W., Vergne, I. and Deretic, V. 2009. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunological Reviews*. 227: 189-202.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Forster, I., and Ruland, J. 2006. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442: 651–656.
- Hansen, M., Rubinsztein, D.C. and Walker, D.W. 2018. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Molecular cell Biology*. 19: 579-593.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Huang, J. and Klionsky, D. J. 2007. Autophagy and human disease. *Cell Cycle* 6: 1837–1849.
- Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock K. and MacLachlan, I. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature Biotechnology*. 23: 457–462.
- Karunasagar, I. and Ababouch, L. 2012. Shrimp viral diseases, import risk assessment and international trade. *Indian journal of virology: an official organ of Indian Virological Society*. 23: 141-148.
- Levine, B. and Kroemer, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27–42.
- Li, B.B., Fan, J.Q., Lu, K.C., Chen, G.L. and Chen, Y.H. 2021. Identification and functional characterization of a systemic RNA interference defective 1 gene in *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology Reports*. 2: 100033.
- Millard, R.S., Ellis, R.P., Bateman, K.S., Bickley, L.K., Tyler, C.R., Aerle, R.V. and Santos, E.M. 2021. How do abiotic environmental conditions influence shrimp susceptibility to disease? A critical analysis focussed on White Spot Disease. *Journal of Invertebrate Pathology*. 186: 107369.
- Mizushima, N., Levine B., Cuervo, A.M. and Klionsky, D.J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 451: 1069-1075.
- Ninawe, A.S. and Selvin, J. 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. *Critical reviews in microbiology*. 35: 43-66.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acid research*. 29: 9-45.
- Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review Fish Diseases* 2: 3-23.
- Sun, Q., Zhang, J., Fan, W., Wong, K.N., Ding, X., Chen S. and Zhong, Q. 2011. The RUN Domain of Rubicon Is Important for hVps34 Binding, Lipid Kinase Inhibition, and Autophagy Suppression. *The journal of Biological Chemistry*. 286: 185-191.
- Virgin, H.W. and Levine, B. 2009. Autophagy genes in immunity. *Nature immunology*. 10: 461-470.
- Wan, Y., Cao, W., Han, T., Ren, S., Feng, J., Chen, T., Wang, J., Broering, R., Lu, M. and Zhu, Y. 2017. Inducible Rubicon facilitates viral replication by antagonizing interferon production. *Cellular & Molecular Immunology*. 14: 607–620.

- Wang, F., Huang, L., Liao, M., Dong, W., Liu, C., Zhuang, X., Liu, Y., Yin, X., Liang, Q. and Wang, W. 2021. Pva-miR-252 participates in ammonia nitrogen-induced Oxidative stress by modulating autophagy in *Penaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 225: 112774.
- Wang, W. and Zhang, X. 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 522–527.
- Wu, W., Lin, X., Wang, C., Ke, J., Wang, L. and Liu, H. 2019. Transcriptome of white shrimp *Litopenaeus vannamei* induced with rapamycin reveals the role of autophagy in shrimp immunity. *Fish and Shellfish Immunology*. 86: 1009-1018.
- Xu, A., Xu, S., Tu, Q., Qiao, H., Lin, W., Li, J., He, Y., Xie, T., Pan, L., Pan, Q., Zhao, Y., Su, X. and Tong, Y. 2022. A novel virus in the family Marnaviridae as a potential pathogen of *Penaeus vannamei* glass post-larvae disease. *Virus Research*. 22: 199026.
- Yang, C.S., Rodgers, M., Min, C.K., Lee, J.S., Kingeter, L., Lee, J.Y., Jong, A., Kramnik, I., Lin, A. and Jung, J.U. 2012. The Autophagy Regulator Rubicon Is a Feedback Inhibitor of CARD9-Mediated Host Innate Immunity. *Cell Host & Microbe* 11: 277–289.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. 2000. RNAi: double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell*. 101: 25–33.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. Luria-Bertani broth (LB broth)

0.5% w/v NaCl	1.5	กรัม
0.5% w/v Yeast extract	1.5	กรัม
1.0% w/v Peptone	3.0	กรัม

#### 2. Luria-Bertani agar (LB agar)

0.5% w/v NaCl	1.5	กรัม
0.5% w/v Yeast extract	1.5	กรัม
1.0% w/v Peptone	3.0	กรัม
1.5% w/v Agar	6.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. 70 % Ethanol

เตรียมได้จากเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยการเตรียมเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้คำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} \text{จากสูตร} \quad C_1V_1 &= C_2V_2 \\ 95\% \times V_1 &= 70\% \times 1,000 \text{ มิลลิลิตร} \\ V_1 &= 736.842 \text{ มิลลิลิตร} \\ &\approx 737 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

วิธีการเตรียม

ผสมเอทานอลความเข้มข้น 95% ปริมาตร 737 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 263 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน

#### 2. 10x TBE buffer

Tris Base	108	กรัม
Boric acid	55.0	กรัม
Double-distilled H <sub>2</sub> O	900	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH8.0	40.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 26 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2565

ข้าพเจ้า นางสาวศิตภัทร รอดภัย รหัสประจำตัว 62050572

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยา ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าสหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การศึกษาบทบาทของยีนรูบิคอนในกุ้งที่ติดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว

ชื่อภาษาอังกฤษ The study of rubicon role in shrimp infection by White Spot Syndrome Virus

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยของข้าพเจ้าแต่เพียงผู้เดียวโดยมิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนโดยใช้โปรแกรมเรียบร้อยแล้วและได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์แล้วโปรแกรมอักขราวิสุทธิ 1.45 %

ลงชื่อ.....ศิตภัทร รอดภัย.....

(นางสาวศิตภัทร รอดภัย)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.วรกฤต วรนนท์กิจ อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษาได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

(ผศ.ดร.วรกฤต วรนนท์กิจ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้